



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA**

**Estudo da resposta inflamatória durante a infecção por
*Trypanosoma rangeli***

STEFANNY LUCÍA VILOCHE MORALES

Florianópolis
2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA**

**Estudo da resposta inflamatória durante a infecção por
*Trypanosoma rangeli***

Trabalho apresentado para o cumprimento da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II (BIO 7016), como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Santa Catarina.

Acadêmica: Stefanny Lucía Viloche Morales
Orientador: Prof. Dr. André Luiz Barbosa Báfica

Florianópolis
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COORDENADORIA DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BIO-5156 / ESTÁGIO II

ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

1. ESTAGIÁRIO(A)

Nome: STEFANNY LUCIA VILCHE MORALES

Número de Matrícula: 07128035

2. ESTÁGIO

Título do Trabalho: ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DURANTE A INFECÇÃO POR
TRYPANOSOMA RANGELI

Orientador(a): ANDRÉ LUIZ BARBOSA BÁFICA

Co-Orientador(a): —

Período do Estágio: 2001-2002

Local da apresentação do Trabalho: MIP08

3. AVALIAÇÃO

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: ANDRÉ BÁFICA Nota: —

Membro Titular: PAULINE STANGE Nota: —

Membro Titular: PAULINE STANGE Nota: —

Membro Suplente: DANIEL MENDES Nota: N/A

MÉDIA FINAL: 10,0 (DE 2)

Florianópolis, 10 de FEVEREIRO de 2012.

André Báfica
PRESIDENTE DA BANCA

Pauline Herman Stange
MEMBRO TITULAR

Pauline Herman Stange
MEMBRO TITULAR

—
MEMBRO SUPLENTE

*A todos que fazem parte da minha
vida, tornando cada dia um dia novo e
especial.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Professor André, que me acolheu quando eu estava “à deriva” procurando meu lugar no mundo da pesquisa e me deu a oportunidade de iniciar um estágio no LIDI, que levou à escrita deste TCC. Obrigada pelos ensinamentos, por me fazer olhar a ciência de forma crítica, pelas conversas e também pela paciência quando eu não conseguia acompanhar os seus *brainstorms*. Agradeço também ao Professor Daniel que, apesar de ter se juntado ao grupo posteriormente, também contribuiu com idéias pertinentes, participando das discussões e análise dos resultados.

Gosto de pensar que ao ter entrado no LIDI dois anos e meio atrás, eu não só ganhei muitos amigos, como ganhei uma segunda família. Por isto gostaria de agradecer de maneira geral a todos os lidianos - pessoas alegres, engraçadas, amigáveis, mas também muito focadas e esforçadas - que contribuíram para tornar o ambiente de trabalho ótimo e divertido.

Aos que passaram pelo laboratório e deixaram muitas lembranças: Rodrigo (Tarsinho, zé louco, zé macena, etc.), Jonatan, Sabrina, ‘Zuelen’, Aninha e Cássia. Foi um grande prazer trabalhar com vocês.

Aos guerreiros que estão aí desde os primórdios; Taty, que me acolheu assim que entrei no lab, me ensinou muitas coisas nanotecnológicas e me fez rir inúmeras vezes com o famoso ‘voo do grilo’. Lucas ‘pululu’, sempre pedindo carinho e mostrando suas camisas novas. Minhas queridas ‘Nicoleis’, minhas grandes amigas e confidentes. Nika (sempre a última a saber das coisas) minha companheira de experimentos, de muitas risadas e gafes também (a santa nuvem preta e Seu Zica que nunca nos deixam!). Nini, a santa, que veio a meu socorro inúmeras vezes, me ajudando a manter a calma quando as coisas não saíam como planejado. Obrigada por ter sempre me ajudado e também por ter me ensinado a fazer contas!

Aos que se juntaram depois, Álvaro ‘corujito’ nosso churrasqueiro oficial (que contribuiu enormemente neste trabalho), o mestre das histologias que enxerga o que os reles mortais não veem. Mari, que apesar de ficar lá no anexo III, sempre vem nos visitar com um sorriso no rosto e nos convence a ver os jogos do CIMED. Vê, a piadista do lab, que está sempre fazendo todo mundo rir (até nos momentos mais difíceis) com seus trocadilhos e músicas temáticas.

As PGs mais novinhas da família, Fer com seu jeito calminho ‘pH neutro’ sempre muito gentil e calma. Livia (o que isso tem de pequeno tem que invocada), com certeza a pessoa mais expressiva que eu conheço, sempre fazendo todo mundo rir com seus gestos e caretas. Renata, a amante de animais sempre muito focada, minha nova colega de aula! Paula que está contagiando todo mundo com seu mineirês e está investindo em uma carreira alternativa na fabricação dos famoso “Polakinhos”.

Aos novatos também, Daniel ‘filho’, Bob, Ingrid e Gabriela que também contribuem para tornar o LIDI um ótimo local de trabalho.

Gostaria de agradecer também o pessoal do Laboratório de Protozoologia pelas conversas de corredor e companhia nos momentos de tédio, em especial Patrícia, Débora, Aline e Ibeth pela disposição em me ceder as culturas de parasitos. Agradeço pelo apoio e pela ajuda.

Aos meus amigos e colegas de curso que tornaram os meus dias mais alegres e divertidos durante estes 5 anos de UFSC; pela diversão nas aulas, pelas longas conversas, pelo desespero estudando para as provas e também pelas excursões aos bares de Florianópolis. Agradeço em especial a ‘galerinha do mal’, Cecilia (a argentina mais legal que eu conheço) que me acompanha desde a quarta série do ensino fundamental, Thais, Kamille que sempre teve paciência pra me ouvir reclamando da vida, Bruna, Daniel ‘Troll’ sempre me pentelando nas aulas, Felipe (gostamos de você mesmo de olhos fechados), Marco (Marlon, Maicon, Marcos, etc.), Yuri ‘monstro horrível’ e Luan. Obrigada pelos inúmeros momentos de risadas, pela convivência e apoio nos momentos difíceis.

Ao Giancarlo, melhor amigo, sempre presente na minha vida, tanto nos momentos de alegria e descontração, quanto nos momentos difíceis. Obrigada pela amizade incondicional e apoio, por me alegrar quando eu estou pra baixo e principalmente, por sempre estar ao meu lado. A meus amigos que não vejo tanto quanto gostaria, principalmente Marina ‘osga’, pois mesmo não nos vendo com tanta frequência, sabemos que sempre podemos contar com o apoio e carinho uma da outra.

À minha família, pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos da minha vida. Pelos conselhos, orientação e incentivo em momentos críticos e na tomada de decisões.

À banca avaliadora deste trabalho, pela disposição e aceite do convite.

Ao CNPq e CAPES pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a minha formação, amadurecimento profissional e pessoal nestes últimos anos.

“Life is pretty simple: You do some stuff. Most fails. Some works. You do more of what works. If it works big, others quickly copy it. Then you do something else. The trick is the doing something else.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

O protozoário parasito não virulento *Trypanosoma rangeli* tem sido proposto como um possível vetor vacinal na proteção contra *Trypanosoma cruzi*, agente causativo da doença de Chagas. Entretanto, detalhes na interação parasito-hospedeiro durante a infecção por *T. rangeli* são pouco conhecidos. Neste estudo, as curvas de parasitemia assim como a resposta imune de camundongos Balb/C injetados i.p. com tripomastigotas derivados de cultura de *T. rangeli* (cepa Choachí) ou *T. cruzi* (cepa Y) foram analisados. Em contraste com a infecção por *T. cruzi*, que apresentou um pico de parasitemia no oitavo dia pós infecção (p.i.), tripomastigotas de *T. rangeli* foram encontrados no sangue de camundongos infectados a partir de 1 dia pós infecção (dpi), apresentando um pico de parasitemia 5 dpi, não sendo mais encontrado no sangue 11 dpi. Além disto, camundongos infectados com *T. rangeli* apresentaram aumento de expressão das citocinas IFN- γ , IL-12p40, IL-6 e TNF- α , além de níveis elevados de citocinas séricas como IL-12p70, MCP-1 e IFN- γ . A análise histológica do fígado mostrou que este parasito promove um infiltrado rico em células mononucleares observado até 30 dpi, sugerindo que estas células estão envolvidas na interação *T. rangeli*-hospedeiro. Para investigar mais a fundo as interações entre o parasito e o hospedeiro, foram realizadas infecções *in vitro* com este parasito. A análise por microscopia de luz de macrófagos incubados com tripomastigotas de *T. rangeli* indicou que a maioria dos parasitos não se encontra dentro dos macrófagos. No entanto, foi detectada a produção de TNF- α e IL-6 durante a infecção, o que indica que estes parasitos são reconhecidos pelos macrófagos levando à formação de uma resposta inflamatória. Estes resultados sugerem que *T. rangeli* pode modular a fagocitose de macrófagos e induzir uma resposta inflamatória persistente *in vivo*.

Palavras-chave: *Trypanosoma rangeli*, inflamação persistente, macrófagos.

ABSTRACT

The avirulent protozoan parasite *Trypanosoma rangeli* has been proposed as a possible vaccine vector protecting against *T. cruzi*, the causative agent of Chagas disease. However, details on parasite-host interactions during *T. rangeli* infection are poorly known. In this study, parasitemia as well as immune responses of Balb/C mice i.p. injected with culture-derived trypomastigotes of either *T. rangeli* (Choachí strain) or *T. cruzi* (Y strain) were assessed. In contrast with *T. cruzi* infection, which presented a parasitemia peak on day 8 p.i., *T. rangeli* trypomastigotes were found in the blood of infected mice as soon as 1 dpi, displaying a peak of parasitemia at 5 days p.i. and cleared from the blood on the 11th day p.i. Moreover, *T. rangeli*-infected mice displayed increased expression of IFN- γ , IL-12p40, IL-6 e TNF- α as well as high levels of serum cytokines such as IL-12, MCP-1 and IFN- γ . Histological analysis of the liver revealed that this parasite elicited an inflammatory infiltrate rich in mononuclear cells observed up to 30 days p.i., suggesting that these cells may play a role on *T. rangeli*-host interactions. To investigate further parasite-cell interactions, *T. rangeli* infectivity was assessed *in vitro*. Light-microscopy analysis of macrophages incubated with *T. rangeli* trypomastigotes revealed that the majority of parasites are not inside macrophages. Despite this fact the production of TNF- α e IL-6 was detected during infection. These results suggest that *T. rangeli* is recognized by macrophages eliciting an inflammatory response and may modulate macrophage phagocytosis and induce persistent inflammatory responses *in vivo*.

Keywords: *Trypanosoma rangeli*, persistent inflammation, macrophages.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1 - Esfregaço sanguíneo de camundongos infectados experimentalmente com tripomastigotas sanguíneos de <i>T. rangeli</i> corado por Giemsa.	1
Figura 2 - Distribuição geográfica de <i>T. cruzi</i> e <i>T. rangeli</i> nas Américas Central e do Sul.	2
Figura 3 - Ciclo do <i>T. rangeli</i> no hospedeiro invertebrado..	3
Figura 4 - Resposta imune inata dependente de TLRs.....	9
Quadro 1 - Sequências iniciadoras utilizadas na análise por qPCR.....	16
Figura 5 - Cinética parasitêmica na infecção por <i>Trypanosoma</i> spp. em modelo murino.	22
Figura 6 - Corte histológico de animais Balb/C naïve, caracterizando a morfologia normal do tecido hepático (10x/40x, H&E).	23
Figura 7 – Histopatologia do tecido hepático de camundongos Balb/C durante a infecção por <i>T. rangeli</i> , 1 e 5 dias após a inoculação (10x/40x, H&E).	25
Figura 8 – Histopatologia do tecido hepático de camundongos Balb/C durante a infecção por <i>T. rangeli</i> , 15 e 30 dias após a inoculação (10x/40x, H&E).....	26
Figura 9 - Histopatologia do tecido adiposo de camundongos Balb/C durante infecção por <i>T. rangeli</i> , 1, 5 e 30 dias após a inoculação (10x/40x, H&E).....	27
Figura 10 - Histopatologia do tecido hepático de camundongos C57BL/6 durante infecção por <i>T. cruzi</i> , 2 e 7 dias após a inoculação (10x/40x, H&E).....	29
Figura 11 - Histopatologia do tecido hepático de camundongos C57BL/6 durante infecção por <i>T. cruzi</i> , 15 e 30 dias após a inoculação (10x/40x, H&E).....	30
Figura 12 – Expressão gênica de citocinas no tecido hepático de animais Balb/C durante infecção por <i>Trypanosoma</i> spp.....	33
Figura 13 – Dosagem dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias em animais Balb/C infectados com <i>Trypanosoma</i> spp.....	35
Figura 14 - Dosagem das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (A) e IL-6 (B) no sobrenadante de BMMs 18 horas após infecção com <i>T. rangeli</i>	37
Figura 15 - Micrografia de BMMs coradas com Giemsa 18 horas após a infecção com MOI 10 de <i>T. rangeli</i> (B) ou <i>T. cruzi</i> (C).....	38
Figura 16 - Infecção de BMMs com <i>Trypanosoma</i> spp. em meio DMEM na presença ou ausência de SBF.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PRR – Receptores de reconhecimento de padrões (do inglês *pattern recognition receptor*)
APC- Célula apresentadora de antígeno (do inglês *antigen presenting cell*)
PAMP- Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês *pathogen-associated molecular pattern*)
DC- Célula dendrítica (do inglês *dendritic cell*)
Mφ- Macrófago
NK- Células *natural killer*
IFN- Interferon
TNF- Fator de necrose tumoral (do inglês *tumor necrosis factor*)
IL- Interleucina
GM-CSF – Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (do inglês *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*)
NO- Óxido nítrico
TLR- Receptores tipo Toll (do inglês *Toll like receptor*)
NFκB- Fator nuclear κB (do inglês *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)
IRF- Fator regulador de interferon (do inglês *Interferon regulatory factor*)
GPI- Glicosil fosfatidil inositol
BMM- Macrófagos derivados de medula óssea (do inglês *bone marrow derived macrophage*)
NLR- Receptores tipo NOD (do inglês *NOD like receptor*)
LIT- *Liver Infusion Tryptose*
SBF – Soro Bovino Fetal
P/S – Penicilina/Streptomicina
PBS- Tampão salina fosfato (do inglês *phosphate buffered saline*)
DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's medium*
DPI- Dias pós-infecção
H&E- Hematoxilina & eosina
qPCR – PCR tempo real
RQ – Quantidade relativa (do inglês *relative quantity*)
PCR- Reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)
MCP-1 - *Monocyte chemotactic protein-1*
λCT- *Comparative threshold cycle*

M-CSF – Fator estimulador de colônias de macrófagos (do inglês *macrophage colony-stimulating factor*)

MOI- Multiplicidade de infecção (do inglês *multiplicity of infection*)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Considerações gerais sobre a biologia de <i>Trypanosoma</i> (<i>Herpetosoma</i>) <i>rangeli</i> Tejera, 1920	1
1.2	Resposta imune da infecção por tripanosomatídeos	6
2.	OBJETIVOS.....	11
2.1	Objetivos específicos.....	11
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1	Parasitos	13
3.2	Avaliação da parasitemia	14
3.3	Coletas	14
3.3.1	Órgãos e tecidos.....	14
3.3.2	Coleta de soro	14
3.4	PCR tempo real	15
3.4.1	Extração de RNA total	15
3.4.2	Síntese de cDNA.....	15
3.4.3	Amplificação do cDNA.....	15
3.5	Dosagem de citocinas.....	16
3.5.1	CBA (cytometric beads array)	16
3.6	Cultivo celular.....	16
3.6.1	Células L929	16
3.6.2	Células VERO	17
3.6.3	Macrófagos derivados de medula óssea (BMM).....	17
3.7	Infecção de BMMs.....	18
3.8	Observação da interação celular por microscopia de luz 18	
3.9	ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	19
4.	RESULTADOS	21

4.1	Parasitemia de animais Balb/C e C57BL/6 infectados com <i>T. rangeli</i> e <i>T. cruzi</i>	21
4.2	Histopatologia	22
4.2.1	<i>Balb/C</i> inoculados com <i>T. rangeli</i>	22
4.2.2	<i>Balb/C</i> inoculados com <i>T. cruzi</i>	28
4.3	Análise da expressão de citocinas pró-inflamatórias no fígado	31
4.4	Dosagem dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias	33
4.5	Infecção de BMMs	36
4.5.1	<i>Dosagem de citocinas pró-inflamatórias in vitro</i>	36
4.5.2	<i>Interação <i>T. rangeli</i>- BMM</i>	37
5.	DISCUSSÃO	41
6.	CONCLUSÕES	45
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre a biologia de *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920

Protozoários do gênero *Trypanosoma* são parasitos com ciclos de vida alternando entre um hospedeiro vertebrado, onde geralmente são encontrados no sangue e tecidos, e um hospedeiro invertebrado, onde estão presentes no trato digestivo de artrópodes ou vetores hematófagos. Estes parasitos infectam uma ampla gama de classes de vertebrados, desde peixes até mamíferos, embora tenham sido mais estudados nestes últimos, por serem considerados de importância médica e veterinária (MYLER, 1993).

Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli (Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae) é um protozoário hemoflagelado de ciclo heteroxênico, sendo o segundo tripanosomatídeo americano descrito capaz de infectar o homem (GUHL & VALLEJO, 2003). Além do núcleo central, *T. rangeli* apresenta um cinetoplasto pequeno e circular, estrutura localizada na matriz mitocondrial contendo arranjos circulares concatenados de DNA, característico da Ordem Kinetoplastida (WHO, 2002; VALLEJO *et al.*, 1988). Duas formas biológicas durante seu ciclo de vida já foram bem caracterizadas; a forma epimastigota proliferativa, que apresenta de 10 a 50 µm de comprimento, incluindo o flagelo livre, e a forma tripomastigota (**Figura 1**), a qual apresenta de 35- 45 µm de comprimento e uma membrana ondulante bem desenvolvida (CUBA CUBA, 1998).



Figura 1 - Esfregaço sanguíneo de camundongos infectados experimentalmente com tripomastigotas sanguíneos de *T. rangeli* corado por Giemsa. Cinetoplasto (c) na porção posterior do parasito e membrana ondulante indicada por uma seta. Aumento de 1.000 vezes. Fonte: STOCO, 2010.

da doença de Chagas (CUBA CUBA, 1998; STEVENS *et al.*, 1999), também está estreitamente relacionado a este por aspectos epidemiológicos. *T. rangeli* apresenta sobreposição de distribuição geográfica com *T. cruzi* em muitas áreas da América Central e do Sul (**Figura 2**), podendo compartilhar triatomíneos vetores da doença de Chagas (CUBA CUBA, 1998), considerada a tripanosomíase de maior impacto sanitário e econômico (DIAS, 2007).



Figura 2- Distribuição geográfica de *T. cruzi* e *T. rangeli* nas Américas Central e do Sul. Áreas sombreadas representam ocorrência de doença de Chagas e pontos (●) representam ocorrência comprovada de *T. rangeli*. Fonte: GRISARD & STEINDEL, 2005.

Diferentemente das demais espécies pertencentes ao subgênero *Herpetosoma*, o *T. rangeli* não apresenta especificidade de hospedeiros, sendo encontrado em uma extensa variedade de reservatórios mamíferos, incluindo as ordens Xenartha, Marsupialia, Carnivora, Rodentia e Primates (CUBA CUBA, 1998). Entretanto, contrariamente ao *T. cruzi*, o *T. rangeli* é considerado não patogênico para o hospedeiro mamífero até o momento (HERBIG-SANDREUTER, 1955; CUBA CUBA, 1998).

No hospedeiro invertebrado, *T. rangeli* difere do ciclo de *T. cruzi* cuja ocorrência se restringe ao intestino dos triatomíneos vetores, tendo

suas formas infectivas liberadas nas fezes e urina para contaminação de hospedeiros mamíferos (GARCIA *et al.*, 2007). No *T. rangeli*, o ciclo inicia quando parasitos são ingeridos na forma de tripomastigotas durante o repasto sanguíneo. Estes parasitos diferenciam-se em epimastigotas no trato digestivo e, a partir da adesão ao epitélio do intestino médio, podem invadir a hemocele, característica chave para identificação desta espécie (GUHL & VALLEJO, 2003; CUBA CUBA, 1998). Alguns dias após a ingestão do parasito, formas epimastigotas aparecem na hemolinfa, multiplicando-se livremente para então migrar para a glândula salivar do inseto, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (**Figura 3**). Durante o repasto sanguíneo estas formas infectivas são transmitidas ao hospedeiro vertebrado pela via inoculativa, através da saliva (GRISARD & STEINDEL, 2005; GARCIA *et al.*, 2009).

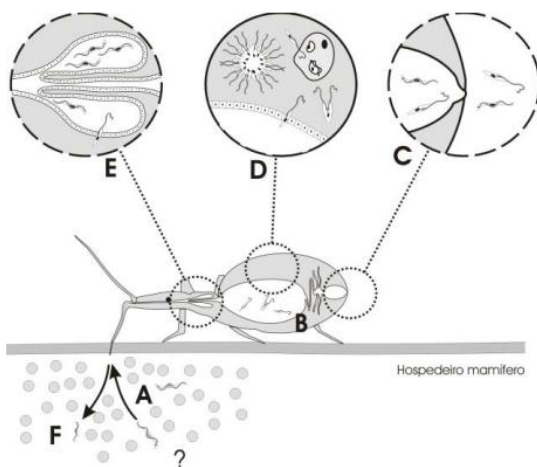


Figura 3- Ciclo do *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado. (A) Ingestão de tripomastigotas durante o repasto sanguíneo; (B) Formas epimastigotas no trato digestivo do triatomíneo; (C) Alguns parasitos se diferenciam em tripomastigotas na ampola retal e podem ser excretados junto a fezes e urina; (D) Adesão de epimastigotas ao epitélio intestinal e invasão da hemocele, onde ocorre sua multiplicação; (E) Passagem para as glândulas salivares e diferenciação para tripomastigotas metacíclicos (forma infectante), as quais são inoculadas com a saliva durante o repasto sanguíneo (F). Fonte: GRISARD & STEINDEL, 2005.

Os insetos vetores de *T. rangeli* pertencem à ordem Hemiptera, família Reduviidae subfamília Triatominae. São conhecidas mais de 130 espécies, no entanto, triatomíneos infectados com este parasito normalmente pertencem ao gênero *Rhodnius*. Além deste gênero, *Triatoma* e *Panstrongylus* também são vetores importantes para *T. cruzi*, tanto para animais domésticos quanto humanos em áreas endêmicas. Por estarem amplamente distribuídos nas Américas, estes três gêneros abrangem diferentes ecossistemas sendo que, em seus habitats naturais, a maioria das espécies entra em contato com aves, mamíferos e répteis (MYLER, 1993). Sabe-se que a susceptibilidade dos triatomíneos, assim como o nível de infecção varia conforme a sua espécie e a cepa do parasito, estando relacionada à localização geográfica (GUHL & VALLEJO, 2003).

Contrariamente ao observado em insetos infectados por *T. cruzi*, triatomíneos infectados com *T. rangeli* podem apresentar patologia (VALLEJO *et al.*, 2009) onde o funcionamento das glândulas salivares pode ser afetado, alterando sua atividade antihemostática e, consequentemente, prolongando a duração do respasto sanguíneo. Além disto, pode ocorrer o aumento do volume de hemolinfa no organismo e alteração no desenvolvimento gerando deformidade nas mudas, o que leva ao aumento da mortalidade destes animais (GARCIA *et al.*, 1994; GUHL & VALLEJO, 2003).

Embora o ciclo no hospedeiro invertebrado já esteja bem descrito, pouco se sabe da interação *T. rangeli*-hospedeiro mamífero. A sua multiplicação intracelular neste hospedeiro permanece controversa apesar de análises histopatológicas de camundongos infectados não terem mostrado evidências desse tipo de comportamento (HERBIG-SANDREUTER, 1955). A literatura tem mostrado resultados heterogêneos quanto à persistência do parasito no sangue periférico destes. Embora *T. rangeli* normalmente apresente baixa parasitemia de curta duração, estudos como o de Urdaneta-Morales & Tejero (1985) mostram que em camundongos há níveis de parasitemia até sete vezes maiores que o inóculo original, sugerindo que o parasito seria capaz de se multiplicar nesse hospedeiro. Entretanto, a maioria dos estudos realizados com tecidos de vertebrados infectados experimentalmente não teve sucesso em demonstrar formas intracelulares nos órgãos. Alguns autores, como Añez (1981) e Añez *et al.*, (1985) não conseguiram demonstrar a presença de parasitos em camundongos e *Didelphis marsupialis* 50 a 60 dias após a infecção por xenodiagnóstico e hemocultura. Por outro lado, existem relatos na literatura que sugerem

a presença de formas proliferativas em mamíferos (SCORZA *et al.*, 1986; OSORIO *et al.*, 1995), como o estudo de Urdaneta-Morales e Tejero (1985), descrevendo formas amastigotas em secções do coração, fígado e baço de camundongos infectados com a cepa Perro-82. Aspectos fundamentais da sua reprodução no hospedeiro vertebrado, que poderiam explicar a aparente falta de virulência, não foram completamente elucidados. Sendo assim, dados a respeito da interação celular e da multiplicação do *T. rangeli* no seu hospedeiro vertebrado são escassos e bastante controversos.

O primeiro caso de infecção humana pelo *T. rangeli* foi evidenciado na Guatemala durante a realização de estudos sobre a doença de Chagas. Desde então, mais de 2.600 casos de infecção humana já foram descritos na Venezuela, Guatemala, Panamá, Colômbia, El Salvador, Costa Rica, Peru e Brasil (D'ALESSANDRO & SARAVIA, 1992; COURA *et al.*, 1996; GRISARD *et al.*, 1999). Apesar de infecções humanas por *T. rangeli* serem registradas frequentemente em diferentes países da América Latina, é difícil estabelecer uma figura global devido às reações cruzadas em exames sorológicos para doença de Chagas, pois embora não seja considerado patogênico para o homem, este parasito induz resposta imune humoral com altos títulos de anticorpos.

Estudos fenotípicos comparativos entre a constituição antigênica de formas epimastigotas de *T. cruzi* e *T. rangeli* indicam o compartilhamento de cerca de 60% da composição antigênica solúvel (AFCHAIN *et al.*, 1979). Nestas circunstâncias, por ter similaridade antigênica com *T. cruzi* e ser considerado não patogênico para os vertebrados, *T. rangeli* tem sido visto como um possível modelo de estudo de vetor vacinal vivo para a doença de Chagas.

1.2 Resposta imune da infecção por tripanosomatídeos

Diferentes moléculas de *T. cruzi* e de *T. rangeli*, especialmente os antígenos de superfície, estão envolvidas na interação do parasito com as células hospedeiras e podem ser alvos da resposta imune do hospedeiro vertebrado. O parasito expressa na sua superfície uma grande variedade de proteínas e glicoproteínas, sendo que algumas delas são cruciais durante os processos de adesão e de penetração na célula hospedeira. A entrada do parasito na célula envolve inicialmente sua adesão à superfície celular, dependente da interação de moléculas de superfície do tripomastigota com receptores da célula hospedeira, seguida da invasão propriamente dita (SOUZA *et al.*, 2010).

As células da imunidade inata tem um papel importante na resposta imune, pois representam a primeira barreira que patógenos enfrentam ao infectar um organismo, dando início à resposta pelo reconhecimento de microrganismos invasores por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes em células apresentadoras de antígenos (APCs) (MEDZHITOV *et al.*, 2000). Estes receptores são capazes de reconhecer estruturas denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), moléculas conservadas e compartilhadas por diversos microrganismos que são responsáveis por iniciar a resposta imune do hospedeiro, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, moléculas coestimulatórias e outros mediadores que inicialmente restringem o crescimento do patógeno e desenvolvem a imunidade adaptativa (IWASAKI *et al.*, 2004; TAKEDA *et al.*, 2003; AKIRA *et al.*, 2006).

Sabe-se que para o controle da infecção por *T. cruzi*, a imunidade inata tem um papel importante suprimindo a replicação do parasito assim como sua dispersão no tecido do hospedeiro durante a fase aguda da infecção. As principais células responsáveis pela defesa imune inata contra a infecção por *T. cruzi* são as células dendríticas (DCs), macrófagos (Mφs) e células *natural killer* (NKs) (ANDRADE *et al.*, 2005; BAFICA *et al.*, 2006; TALVANI, 2004). Estas células também são responsáveis pela produção de citocinas como interferon gama (IFN-γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina-12 (IL-12) e fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), que ativam o sistema mononuclear fagocítico e o metabolismo oxidativo (MENEZES *et al.*, 2004; UMEKITA *et al.*, 2000).

A indução de mediadores pró-inflamatórios, como IL-12, TNF-α e óxido nítrico (NO) através da ativação de receptores da imunidade

inata é responsável pela parasitemia e morte de animais experimentalmente infectados com *T. cruzi* (KAYAMA & TAKEDA, 2010). Na resposta imune contra patógenos intracelulares, IL-12 é um mediador importante da produção de IFN- γ pela indução do desenvolvimento celular do tipo Th1 e a ativação de NKs. IFN- γ tem um papel fundamental na ativação de macrófagos, que são capazes de atingir parasitos intracelulares principalmente por NO, que tem efeito citotóxico ou citostático para organismo intracelulares (TORRICO *et al.*, 1991; HOLSCHER *et al.*, 1998; GRAEFE *et al.*, 2003)

Dentre os PRRs, os receptores melhor descritos e caracterizados são os do tipo Toll (TLR). Eles estão localizados na membrana plasmática ou endoplasmática e reconhecem padrões de componentes de microrganismos, como proteínas estruturais, componentes da parede bacteriana ou ácidos nucleicos (AKIRA *et al.*, 2006). O reconhecimento de ligantes se dá pela porção citoplasmática dos TLRs, conhecido como domínio de homologia Toll/IL-1R (TIR), iniciando a via de sinalização pela associação de moléculas adaptadoras contendo um domínio TIR, como o MyD88, TRIF e TRAM, culminando na ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear κ B (NF- κ B) e fator regulador de interferon (IRF), que levam à expressão de citocinas inflamatórias e genes de quimiocinas que participam da resposta contra microrganismos (AKIRA *et al.*, 2001).

Diversas moléculas derivadas de *T. cruzi* agem como agonistas de TLRs. TLR2 foi o primeiro receptor desta família cujo envolvimento foi demonstrado na indução da resposta imune inata durante a infecção. Na superfície das formas tripomastigotas deste parasito existem moléculas ancoradas por âncoras de glicosil fosfatidil inositol (GPI), como glicoproteínas semelhantes a mucinas, cujo reconhecimento via TLR2 leva à produção de citocinas pró-inflamatórias e NO (CAMARGO *et al.*, 1997). Apesar de todos eucariotos apresentarem GPIs, apenas alguns parasitos, incluindo *T. cruzi*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania major* e *Toxoplasma gondii*, expressam de 10 a 100 vezes mais moléculas, que são estruturalmente diferentes das GPIs das células do hospedeiro.

Apesar de estudos anteriores indicarem que o TLR4 não está envolvido no reconhecimento de âncoras GPI, moléculas livres chamadas GILPs, presentes nas formas epimastigotas de *T. cruzi*, foram demonstradas como ativadoras de vias de sinalização por CD14 e TLR4 (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Outro TLR que participa no reconhecimento de *T. cruzi* é o TLR9. Camundongos TLR9^{-/-} apresentaram parasitemia elevada e aumento da susceptibilidade após infecção em comparação

aos animais selvagens. Além disto, os animais nocautes para TLR9 apresentaram níveis séricos mais baixos de IL-12p40 e IFN- γ (BAFICA *et al.*, 2006). Neste contexto, foi relatado que DNA de diversos protozoários de hábito parasito, incluindo tripanosomatídeos, tem funções imunoregulatórias, o que leva a crer que no genoma destes organismos possa haver motivos CpG em abundância que induzem a ativação do sistema imune inato através de TLR9 (KAYAMA & TAKEDA, 2010). Além dos receptores citados acima, acredita-se que outros TLRs possam ser ativados por componentes derivados de *T. cruzi* e participar na regulação da resposta imune.

Após o reconhecimento por TLRs, a resposta pode ocorrer por uma via dependente ou independente de MyD88. Sabe-se que em animais MyD88^{-/-} infectados com *T. cruzi*, ocorre uma diminuição na produção de IL-12p40 e, conseqüentemente, de IFN- γ (TRINCHIERI & SHER, 2007). Animais TLR2^{-/-}, não apresentaram uma diminuição tão acentuada na produção de TNF- α , IL-12p40 e NO, como observado em camundongos MyD88^{-/-}, indicando a ocorrência de ativação alternativa de outros TLRs como o TLR4 e TLR9 que também são dependentes da via MyD88. Animais duplo nocaute para TLR2 e TLR9 apresentaram maior susceptibilidade a infecção por *T. cruzi*, comparável aos animais MyD88^{-/-}, com aumento significativo na parasitemia, sugerindo que estes dois receptores são os principais envolvidos no reconhecimento do parasito (BAFICA *et al.*, 2006).

Além da via dependente de MyD88, há outra molécula adaptadora chamada TRIF que leva a ativação via TLR3 e TLR4 de forma independente de MyD88, induzindo a produção de IFNs do tipo I. Sabe-se que vários patógenos intracelulares como bactérias (e.g. *Listeria monocytogenes* e *Mycobacterium tuberculosis*) e protozoários como *L. major* e *T. cruzi* induzem IFNs tipo I (SONNENFELD & KIERSZENBAUM, 1981). Em M ϕ e DCs de animais MyD88^{-/-} infectados com *T. cruzi*, a expressão de IFN- β mantém-se a mesma, apesar da expressão de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α e IL-6, diminuir. Entretanto, M ϕ s e DCs de animais duplo nocaute para MyD88 e TRIF apresentaram diminuição significativa na expressão de IFN- β e citocinas pró-inflamatórias. Estes resultados sugerem que IFN- β é induzido por uma via independente de Myd88 (TRIF dependente) e também exerce um papel importante na resistência à infecção por *T. cruzi* (KOGA *et al.*, 2006). Tendo em vista que TLR3 e TLR4 são conhecidos por serem capazes de ativar essa via, GILPs, que ativam o TLR4, seriam um dos possíveis candidatos a estimular esta via, levando

a produção de IFN- β (**Figura 4**).

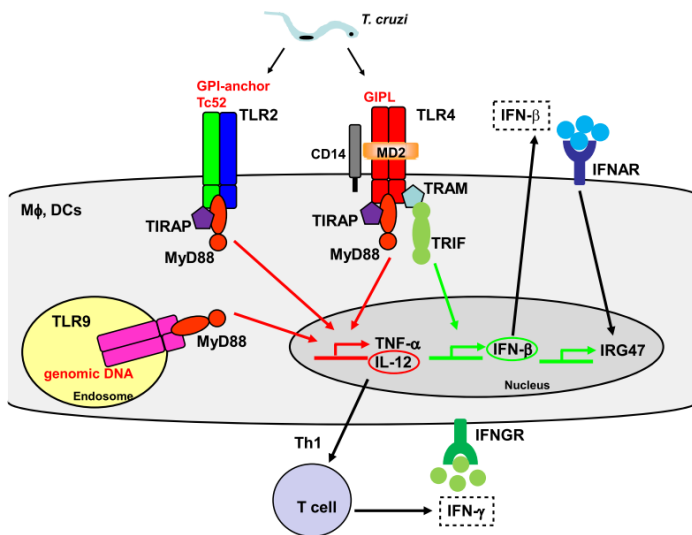


Figura 4 - Resposta imune inata dependente de TLRs. Os componentes derivados de *T. cruzi* são reconhecidos por TLR2, TLR4 e TLR9, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12p40 e IFN- β . Fonte: KAYAMA & TAKEDA, 2010.

A infecção com a cepa Y de *T. cruzi* induz a expressão de IFN- β em fibroblastos de embrião, assim como macrófagos derivados de medula óssea (BMM) (CHESLER *et al.*, 2008). Neste mesmo estudo foi observada produção de IFN- β por BMMs de animais duplo nocaute para MyD88 e TRIF, indicando a presença de mecanismo independentes de TLR para a expressão de IFN de tipo I durante a infecção por *T. cruzi*. A expressão de IFN- β só foi eliminada em células provenientes de camundongos deficientes em TBK1 ou IRF3, ambas moléculas que atuam na via de sinalização de sensores de RNA citoplasmático como RIG-I e MDA5. Desta forma, as moléculas citoplasmáticas que reconhecem *T. cruzi* e ativam a via TBK/IRF3 para indução de IFN tipo I ainda precisa ser mais bem elucidadas.

Outra família de PRRs que tem reconhecimento de microrganismo no citoplasma de forma independente ao TLR são os receptores tipo NOD (NLR). BMMs derivados de camundongos Nod1^{-/-} na presença de IFN- γ , não foram capazes de restringir a infecção por *T.*

cruzi por problemas na indução de produtos de NFκB. Camundongos nocaute para Nod1 apresentam maior susceptibilidade à infecção por *T. cruzi*, o que pode ser observada pelo aumento na parasitemia e alta mortalidade (SILVA *et al.*, 2010). Entretanto, até o momento não se sabe qual componente derivado de *T. cruzi* atuaria como agonista de Nod1.

Os mecanismos de interação entre células do sistema imune inato e parasitos já estão descritos para alguns tripanosomatídeos, como *T. cruzi*, entretanto há uma lacuna no que tange o conhecimento da interação com células fagocíticas e resposta imune gerada por infecções de *T. rangeli*. Desta forma, **a proposta deste estudo foi investigar a resposta inflamatória durante a infecção por *T. rangeli*.**

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a resposta imune *in vivo* e *in vitro* durante a infecção por *Trypanosoma rangeli*.

2.1 Objetivos específicos

- I. *Avaliar a parasitemia e histopatologia de camundongos Balb/c inoculados com T. rangeli;*
- II. *Estudar o perfil de expressão dos genes codificantes para citocinas pró-inflamatórias durante a infecção;*
- III. *Estudar a interação de macrófagos derivados de medula óssea com T. rangeli;*
- IV. *Dosar os níveis de citocinas pró-inflamatórias in vitro.*

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Parasitos

Para este estudo foram utilizadas as formas epimastigota e tripomastigota da cepa Choachí de *T. rangeli*, isolada de glândulas salivares do hemíptero *R. prolixus* naturalmente infectado capturado na Colômbia (SCHOTTELIUS, 1987), assim como epimastigota e tripomastigota da cepa Y de *T. cruzi* (PEREIRA DA SILVA & NUSSENZWEIG, 1953). Os epimastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi* foram cultivados a 27°C em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 50 U/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina (Cultilab) sendo submetidos a repiques semanais. Ambas as cepas utilizadas encontram-se depositadas no criobanco do Laboratório de Protozoologia (MIP/CCB/UFSC).

A partir do momento onde os epimastigotas de *T. rangeli* cultivados em meio LIT atingiam a fase exponencial de crescimento, 12×10^7 parasitos foram separados e lavados duas vezes com PBS (tampão salina fosfato) para então serem transferidos para garrafas de cultura de 25cm³ sem aeração com 15 ml de DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) pH 8,0 (Sigma-Aldrich) suplementado com 5% de SBF, 1g/l de glicose e 6mM de L-glutamina. As culturas foram mantidas a 27°C durante 7-8 dias e a porcentagem de tripomastigotas foi avaliada em lâmina corada com Giemsa (Merck) pela contagem e análise morfológica de 100 parasitos. No oitavo dia de cultura é esperado cerca de 95% de parasitos diferenciados (KOERICH *et al.*, 2002).

Para diferenciação de *T. cruzi*, cerca de 10^7 epimastigotas foram transferidos para meio LIT e mantidos em estufa a 27°C por 10 dias. Após o sétimo dia, a diferenciação dos parasitos foi monitorada retirando uma gota do sobrenadante para visualização em microscópio óptico sendo que, no décimo dia se observa aproximadamente 70% de diferenciação. Os tripomastigotas obtidos foram usados na infecção experimental de camundongos e foram recuperados na forma de tripomastigotas sanguíneos para serem usados na infecção de monocamadas de células Vero em meio DMEM pH 7,4 suplementado com 2,5% de SBF e 0,1% Penicilina/Streptomicina (P/S) a 37°C, 5% CO₂, conforme descrito por Moraes *et al.* (2008). As formas

tripomastigotas foram coletadas do sobrenadante de cultura após 72 horas de infecção (EGER-MANGRICH *et al.*, 2001).

3.2 Avaliação da parasitemia

Tripomastigotas foram coletados das garrafas de cultura e centrifugados a 1510 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram lavados duas vezes em PBS estéril. Os parasitos foram recuperados em PBS estéril de forma a obter uma concentração de $5 \times 10^3/\text{ml}$ e $5 \times 10^7/\text{ml}$ de *T. cruzi* e *T. rangeli*, respectivamente. Camundongos Balb/C de 5-7 semanas de idade foram inoculados pela via intraperitoneal (i.p.) com 200 μl da suspensão (inóculo por animal de 10^3 *T. cruzi* e 10^7 *T. rangeli*). A parasitemia foi monitorada diariamente pela contagem de parasitos na corrente sanguínea em 5 μl de sangue fresco coletado da veia da cauda até que nenhum parasito seja detectado.

3.3 Coletas

3.3.1 Órgãos e tecidos

Os camundongos foram eutanasiados para a coleta de órgãos e tecidos; para animais Balb/c inoculados com *T. rangeli*, as coletas foram realizadas 1, 5, 15 e 30 dias pós infecção (dpi), para animais inoculados com *T. cruzi*, as coletas foram realizadas 2, 7, 15 e 30 dpi. De ambos os grupos foram coletados o coração, fígado, baço, músculos esquelético e cardíaco, timo, tecido adiposo, intestino, pâncreas e SNC. Para análise histopatológica, porções dos órgãos e tecidos foram conservadas em solução tamponada de formalina a 10% (PBS + formalina) para posterior inclusão em parafina e preparação de lâminas histológicas coradas com hematoxilina eosina (H&E).

Porções do baço, fígado, músculo cardíaco e músculo esquelético dos animais foram coletadas para realização de PCR tempo real. As amostras foram conservadas congeladas em placas de 24 poços a -20°C , imersas em RNAlater (Qiagen), reagente que neutraliza a ação de RNases, mantendo o RNA da amostra íntegro para futuras extrações.

3.3.2 Coleta de soro

A coleta de sangue total foi realizada em tubos com EDTA por punção dos pilares caudais ou punção cardíaca dos animais nos

intervalos mencionados na seção 3.3.1. Foram coletados cerca de 500µl por camundongo para obtenção de 200-300µl de plasma através da centrifugação a 945 g por 10 minutos. O plasma obtido foi fracionado em duplicata (100-150µl/poço) e armazenado sob congelamento a -20°C em placas de 96 poços.

3.4 PCR tempo real

3.4.1 Extração de RNA total

Os órgãos e tecidos armazenados em RNAlater foram homogeneizados com Tissuextractor (Qiagen) em TRIzol® Reagent (Invitrogen). Este reagente mantém a integridade do RNA enquanto rompe as células e dissolve seus componentes celulares, liberando o RNA. A extração foi realizada conforme indicado pelo fabricante e o RNA obtido no final do procedimento foi armazenado a -80°C. Este foi dosado e avaliado quanto à sua pureza em espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare Life Sciences), observando-se a absorbância a 260 nm, além da relação 260/280 nm, que indica possível contaminação com proteínas.

3.4.2 Síntese de cDNA

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg do RNA extraído. A síntese foi efetuada através da reação com o kit Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante usando random primers.

3.4.3 Amplificação do cDNA

A análise da expressão gênica de citocinas no fígado foi avaliada por qPCR 1, 5, 15, 30 dpi para animais Balb/C infectados com *T. rangeli* e 2, 7, 15 e 30 dpi para animais infectados com *T. cruzi*, usando o kit SYBR® green Master Mix (Applied Biosystems) no equipamento StepOnePlus™, seguindo as especificações do fabricante. As amplificações de cDNA foram feitas utilizando-se sequências iniciadoras dos genes codificantes para as citocinas TNF-α, IL-6, IL-12p40, IL-10 e IFN-γ. Como controle interno da reação foram utilizados iniciadores para amplificação do gene de expressão constitutiva 18S, presente no RNA ribossomal (**Quadro 1**).

Quadro 1- Sequências iniciadoras utilizadas na análise por qPCR.

Genes	Sequência iniciadora	Fonte
TNF	5'-AAA-ATT-CGA-GTG-ACA-AGC-CTG-TAG-3'	Lofstrand
	5'-CCC-TTG-AAG-AGA-ACC-TGG-GAG-TAG-3'	
IL-6	5'-GGC-CTT-CCC-TAC-TTC-ACA-AG-3'	Lofstrand
	5'-ATT-TCC-ACG-ATT-TCC-CAG-AG-3'	
IL-12p40	5'- CTC-ACA-TCT-GCT-GCT-CCA-CAA-G-3'	Lofstrand
	5'- AAT-TTG-GTG-CTT-CAC-ACT-TCA-GG-3'	
IL-10	5'-GGT-TGC-CAA-GCC-TTA-TCG-GA-3'	Lofstrand
	5'-ACC-TGC-TCC-ACT-GCC-TTG-CT-3'	
IFN- γ	5'-AGA-GCC-AGA-TTA-TCT-CTT-TCT-ACC-TCA-G-3'	Lofstrand
	5'-CTT-TTT-TCG-CCT-TGC-TGT-TG-3'	
18S	5'-TCA-AGA-ACG-AAA-GTC-GGA-GGT-T-3'	Invitrogen
	5'-GGACATCTAAGGGCATCACAG-3'	

Todos os dados foram gerados pelo método *comparative threshold cycle* (λ CT), normalizando em relação ao gene constitutivo e expressando os resultados em *fold change* comparado com os controles não infectados.

3.5 Dosagem de citocinas

3.5.1 CBA (cytometric beads array)

Os níveis séricos de citocinas de camundongos infectados com *T. rangeli* ou *T. cruzi* foram determinados por citometria de fluxo (FACS Calibur, BD Biosciences) através do kit Mouse Inflammation (BD Biosciences), conforme o protocolo do fabricante. A técnica de CBA permite a quantificação simultânea de múltiplas proteínas no analito através de *beads* recobertas com anticorpos. Cada *bead* tem uma intensidade de fluorescência única, desta forma, elas podem ser misturadas e usadas simultaneamente no mesmo tubo, permitindo a avaliação de um painel de citocinas (neste caso, IL-6, IL-10, MPC-1, IFN- γ , TNF- α e IL-12p70) em um volume reduzido de soro (50 μ l).

3.6 Cultivo celular

3.6.1 Células L929

L929 é uma linhagem de fibroblastos murinos imortalizados mantida em cultura em meio DMEM (Invitrogen) suplementado com 100 μ g/ml streptomicina/penicilina (P/S) (Gibco), 2mM L-glutamina (Gibco), 1mM sódio piruvato (Sigma), 25mM HEPES (Cellgro) + 10%

de soro bovino fetal (Gibco). O sobrenadante de cultura é usado para diferenciação de macrófagos, pois possui fatores importantes como o M-CSF e GM-CSF. As células foram descongeladas, transferidas e mantidas em uma garrafa de cultura de 25cm² até a formação de uma monocamada. Uma vez atingida a confluência, as células foram destacadas com tripsina 0,05% EDTA (Invitrogen) e transferidas para uma garrafa de cultura de 75 cm². O processo foi repetido novamente de forma a obter uma cultura em garrafa de 150 cm² com 300 ml de meio. Dez dias após a transferência das células para esta garrafa o sobrenadante de cultura foi coletado, filtrado em filtro 0,22 µm, aliquotado e estocado a -20 °C para uso.

3.6.2 Células VERO

A linhagem VERO corresponde a células epiteliais provenientes de rim de macaco, e foi usada para expansão de tripomastigotas de *T. cruzi*. O cultivo destas células foi realizado em garrafas de cultura de 25cm² mantidas a 37°C, 5% CO₂ em DMEM suplementado com 2,5% SBF e 10µg/ml de P/S. A partir do momento onde ocorreu formação de monocamada, as células foram tripsinizadas para realizar passagens ou ainda, foram transferidas para garrafas 75cm², onde eram infectadas com *T. cruzi* e mantidas até o momento da coleta dos tripomastigotas no sobrenadante de cultura.

3.6.3 Macrófagos derivados de medula óssea (BMM)

Camundongos C57BL/6 foram eutanasiados para remoção dos ossos das patas posteriores em fluxo laminar. A tíbia e o fêmur foram separados manualmente e suas extremidades foram cortadas para realizar a lavagem da medula. A lavagem dos ossos foi feita com o auxílio de uma seringa com agulha de insulina contendo meio DMEM incompleto. Uma vez obtida a suspensão de células, esta foi centrifugada a 453 g por 5 minutos e em seguida o sobrenadante foi descartado. O “pellet” foi desfeito manualmente e então recuperado em 36 ml de meio DMEM suplementado com 100µg/mL S/P, 2mM L-glutamina, 1mM sódio piruvato, 25mM HEPES, 10% SBF Hyclone (SBF; Thermo scientific) e 20% sobrenadante de L929, para ser distribuído em 2 placas de 6 poços, de forma que cada poço ficou com 3 ml da suspensão celular. Após o plaqueamento das células, estas foram mantidas em incubadora a 37°C, 5% CO₂ até sua diferenciação. No quinto dia de cultivo, foram adicionados 2mL em cada poço de DMEM

completo, 10% SBF, 20% L929, para aumentar a diferenciação dos macrófagos. No sétimo dia de cultivo as células estavam prontas para serem usadas.

3.7 Infecção de BMMs

No sétimo dia de cultura, a monocamada de células foi tripsinizada e centrifugada a 565 g por 5 minutos. O pellet foi recuperado em DMEM e uma alíquota da suspensão de parasitos foi corada com Trypan blue 0,4% (Gibco), corante indicador de viabilidade celular, permitindo somente a contagem de células vivas em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços de fundo chato em uma concentração de $2-5 \times 10^5$ em 200 µl por poço e mantidas 18 horas em estufa de CO₂, para que as células possam aderir à placa.

Para os experimentos de interação e infecção de *T. rangeli* e *T. cruzi*, foram realizadas triplicatas na multiplicidade de infecção (MOI) de 10, ou seja, $2-5 \times 10^6$. Além disto, foram feitas duplicatas controle onde as células não foram infectadas e onde elas foram estimuladas com LPS na concentração de 100 ng/poço, cujo tratamento levaria à produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6. Também foram usados parasitos inativados por calor a 56 °C por 1 hora, nas placas de infecção na mesma multiplicidade de infecção usada para parasitos vivos. Foram realizadas infecções com tempos de incubação de 3 e 18 horas.

Após os tempos de incubação mencionados, o sobrenadante de cada poço foi homogeneizado, coletado e armazenado a -20°C de forma a evitar a degradação de proteínas no meio para posterior dosagem de citocinas por ELISA, sendo que 20 µl de cada poço foram separados para contagem de parasitos em câmara de Neubauer.

3.8 Observação da interação celular por microscopia de luz

As placas de infecção foram lavadas duas vezes com PBS e coradas com Giemsa para possibilitar a observação e contagem por microscopia de luz. Para cada poço foram contados cinco campos distintos, onde foi determinado o número de células, número de parasitos intracelulares e extracelulares, assim como o número de células infectadas. A partir destas observações foram calculadas a porcentagem de células infectadas e número de parasitos por 1000

células além do número de parasitos no sobrenadante (contados em câmara de Neubauer).

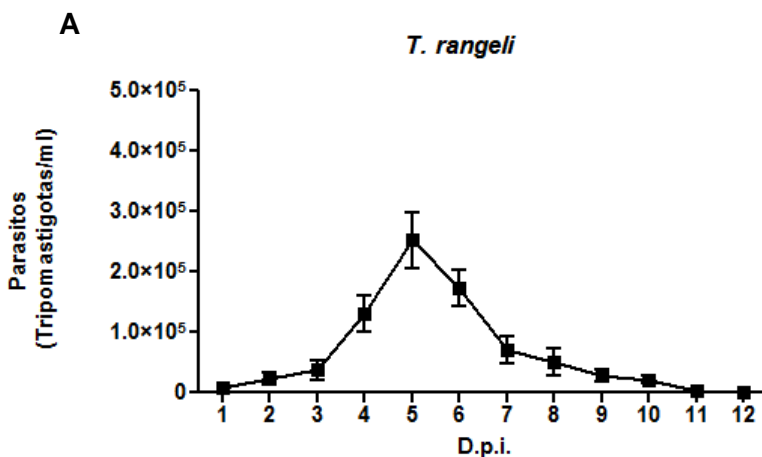
3.9 ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

O perfil geral de produção de citocinas pelas células infectadas *in vitro* foi avaliado pela dosagem de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, no sobrenadante das culturas infectadas por ELISA usando o kit Ready-Set-Go! (eBiosciences), seguindo as especificações do fabricante.

4. RESULTADOS

4.1 Parasitemia de animais Balb/C e C57BL/6 infectados com *T. rangeli* e *T. cruzi*

Após a inoculação dos animais com as formas tripomastigotas de *T. cruzi* ou *T. rangeli*, a parasitemia foi monitorada diariamente. Foram observados tripomastigotas de *T. rangeli* na corrente sanguínea de animais Balb/C infectados desde o primeiro dia, atingindo o pico 5 dias após a infecção e não sendo mais detectados 11 dpi. Proliferação de *T. rangeli* não foi detectada através da parasitemia (**Figura 5A**). Contrariamente ao observado em animais inoculados com *T. rangeli*, parasitos foram detectados somente a partir de 6 dpi em animais infectados com *T. cruzi*. A cinética parasitêmica destes animais revelou dois picos distintos, o primeiro foi atingido no oitavo dia e o segundo 15 dpi após a inoculação. Também foi possível observar através da parasitemia a proliferação de *T. cruzi*, uma vez que nestes animais foram detectados trinta vezes mais parasitos do que no inóculo. Estes parasitos persistiram na circulação até 19 dpi (**Figura 5B**).



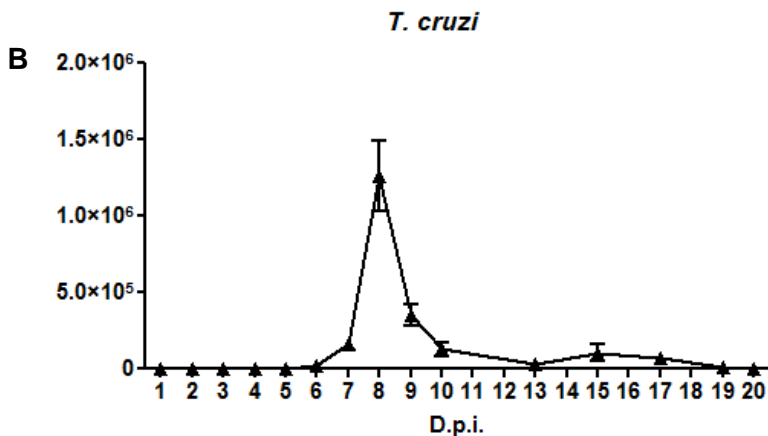


Figura 5- Cinética parasitêmica na infecção por *Trypanosoma* spp. em modelo murino. Camundongos Balb/C (A) foram inoculados com 10^7 tripomastigotas de *T. rangeli* por animal ou 10^3 tripomastigotas de *T. cruzi* (B). Os valores correspondem à média de parasitemia de 20 animais.

4.2 Histopatologia

Os dias de coleta dos órgãos foram determinados a partir da parasitemia, de forma a realizar uma coleta antes do pico de parasitemia, durante o pico de parasitemia e após o pico de parasitemia. Para animais inoculados com *T. rangeli* estas datas corresponderam a 1, 5, 15 e 30 dias após a infecção e para animais infectados com *T. cruzi*, as coletas foram realizadas 2, 7, 15 e 30 dpi.

4.2.1 Balb/C inoculados com *T. rangeli*

Cortes histológicos de coração, fígado, baço, músculos esquelético e cardíaco, timo, tecido adiposo, intestino, pâncreas e SNC foram analisados, entretanto, foram observadas alterações morfológicas ou de celularidade apenas nos tecidos hepático e adiposo. Podemos observar na **Figura 6** um corte histológico de um animal naíve com veia porta, artéria hepática e ducto biliar, caracterizando o tecido hepático, apresentando morfologia e celularidade normais.

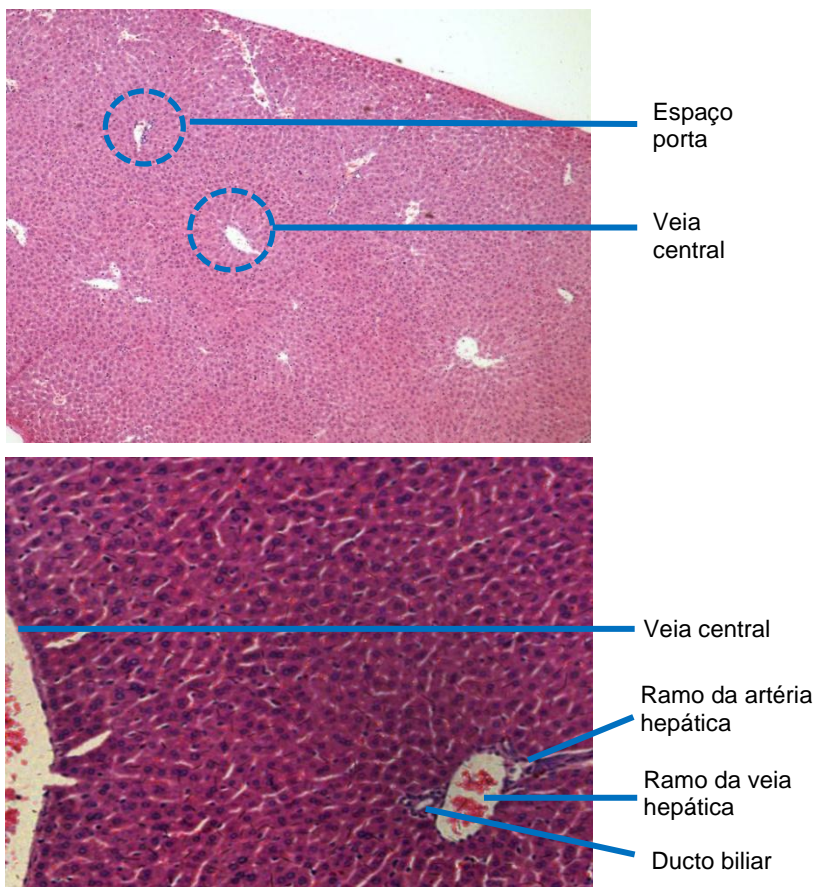


Figura 6- Corte histológico de animais Balb/C naïve, caracterizando a morfologia normal do tecido hepático (10x/40x, H&E).

No primeiro dia após a inoculação de tripomastigotas, podemos observar aumento citoplasmático dos hepatócitos, principalmente na região próxima ao espaço porta. Além disto, há presença de edema e infiltrado mononuclear leve com tendência perivascular. Este infiltrado torna-se moderado e difuso pelo tecido 5 dpi com focos perivascular. Há dilatação do citoplasma dos hepatócitos e pode-se observar leve degeneração próxima ao espaço porta. Quinze dias após a inoculação,

há presença de infiltrado mononuclear difuso intenso com focos perivascularres. A dilatação do citoplasma dos hepatócitos ainda pode ser observada, assim como a presença de edema, principalmente no espaço porta. Também há degeneração leve e necrose nesta região. Esta tendência se mantém 30 dpi com infiltrado mononuclear difuso intenso com focos perivascularres e degeneração no espaço porta (**Figura 7 e 8**).

Simultaneamente foi observada alteração na celularidade do tecido adiposo, com infiltrado focal misto linfohistioplasmocitário com predominância de mononucleares cinco dias após a inoculação. Este perfil se manteve 30 dpi, porém de maneira difusa no tecido (**Figura 9**).

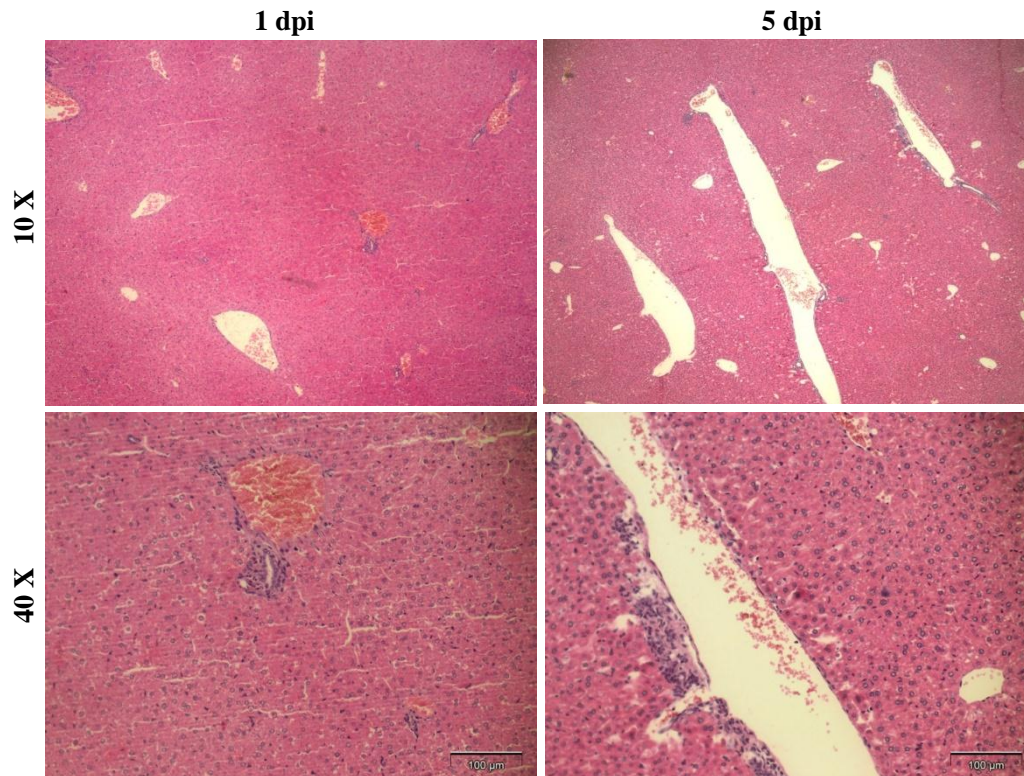


Figura 7 – Histopatologia do tecido hepático de camundongos Balb/C durante a infecção por *T. rangeli* , 1 e 5 dias após a inoculação (10x/40x, H&E).

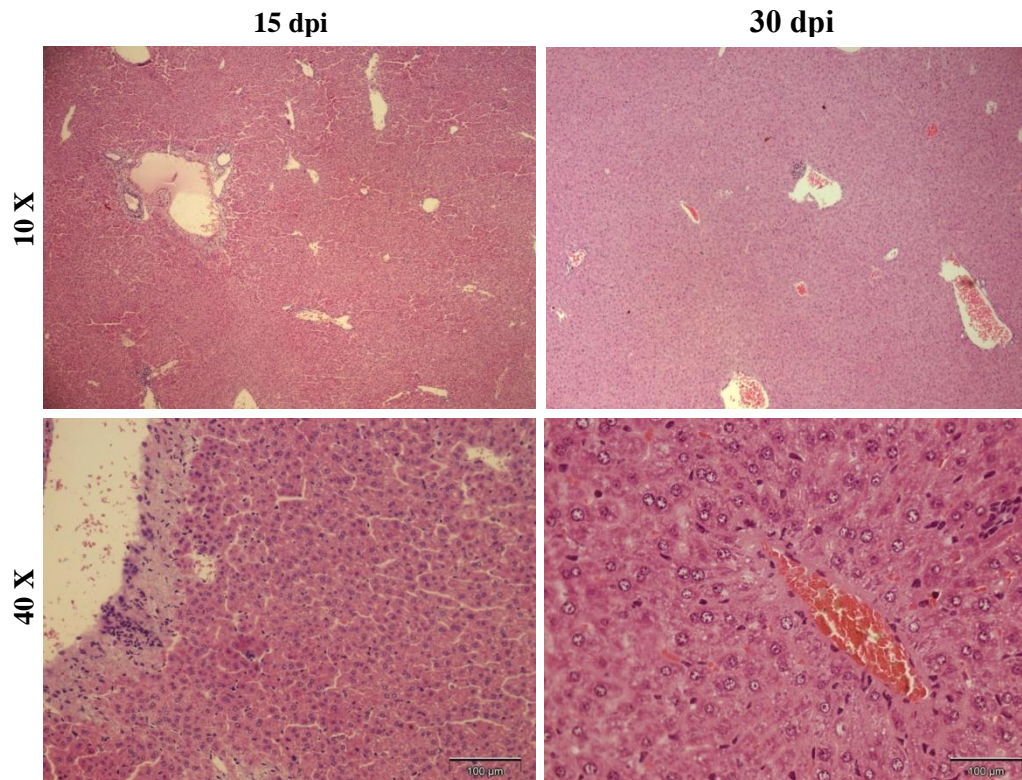


Figura 8 – Histopatologia do tecido hepático de camundongos Balb/C durante a infecção por *T. rangeli* , 15 e 30 dias após a inoculação (10x/40x, H&E).

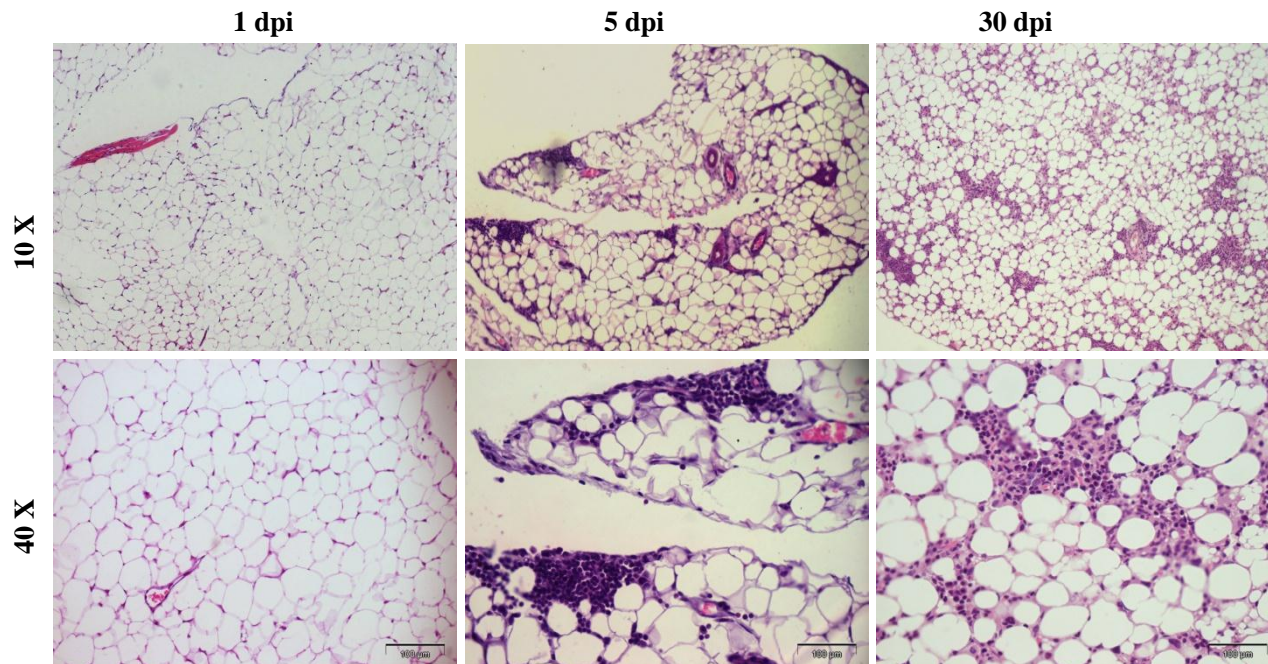


Figura 9- Histopatologia do tecido adiposo de camundongos Balb/C durante infecção por *T. rangeli*, 1, 5 e 30 dias após a inoculação (10x/40x, H&E).

4.2.2 *Balb/C inoculados com T. cruzi*

A análise dos cortes histológicos do tecido hepático de animais infectados com *T. cruzi* revelou um infiltrado mononuclear perivascular leve a partir do sétimo dia após a inoculação. Este infiltrado aumentou de intensidade e tornou-se difuso com focos perivasculares 15 dpi mantendo o mesmo padrão até 30 dias após a inoculação, com a presença de regiões necróticas no espaço porta e congestão intensa (**Figura 10 e 11**). Ao contrário do observado em animais infectados com *T. rangeli*, não foi observada nenhuma modificação morfológica no tecido adiposo destes animais.

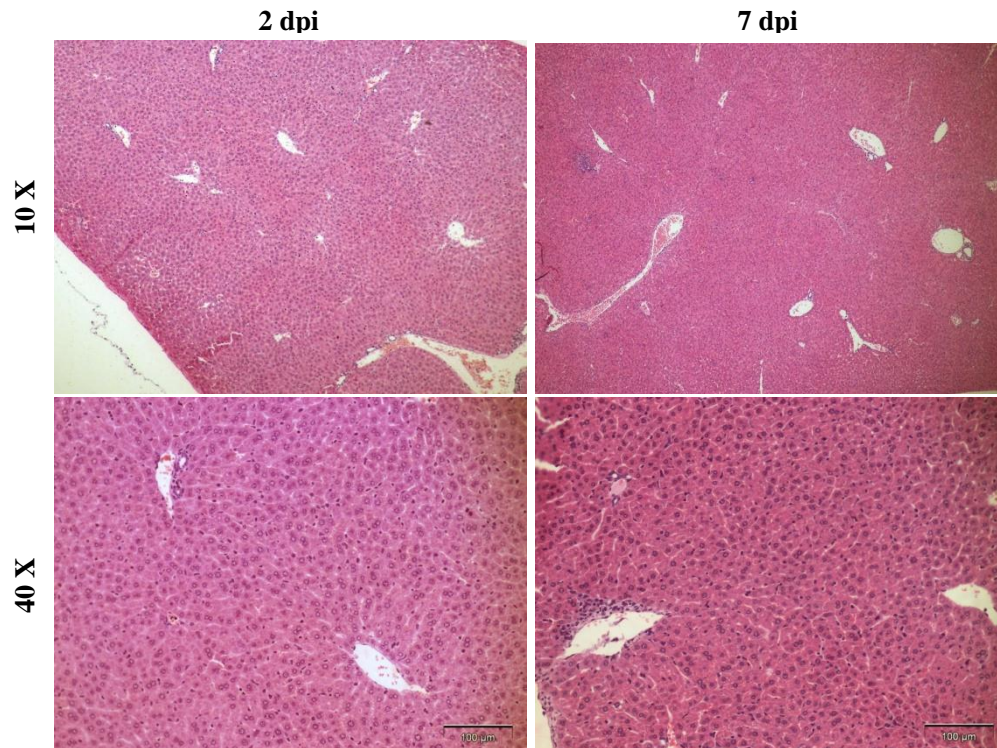


Figura 10- Histopatologia do tecido hepático de camundongos C57BL/6 durante infecção por *T. cruzi*, 2 e 7 dias após a inoculação (10x/40x, H&E).

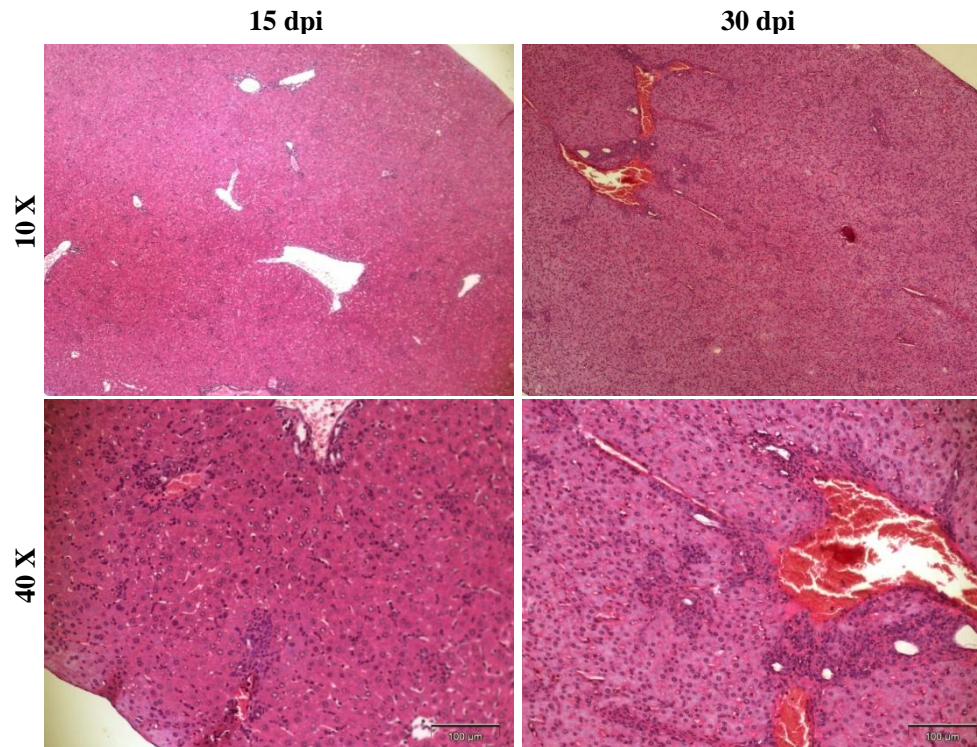
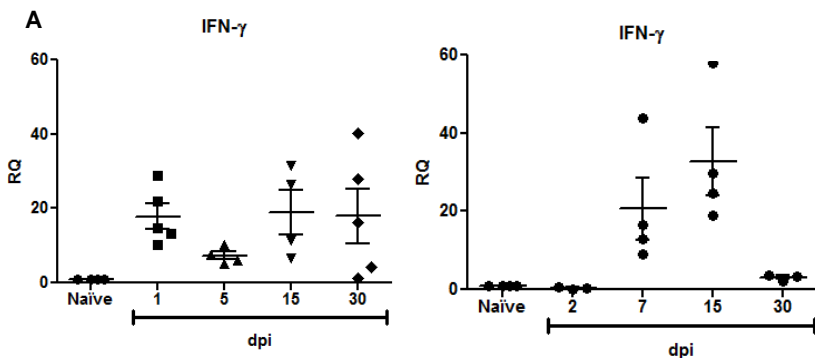


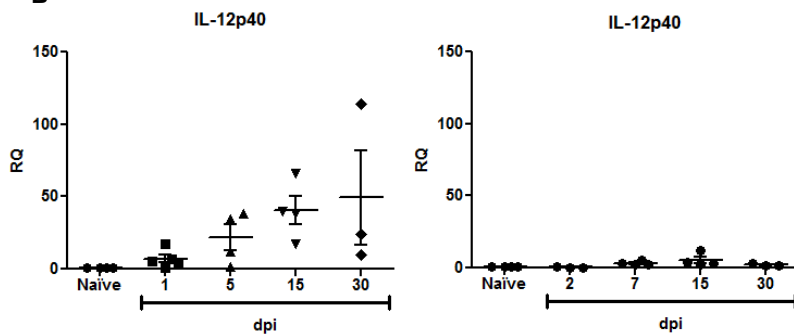
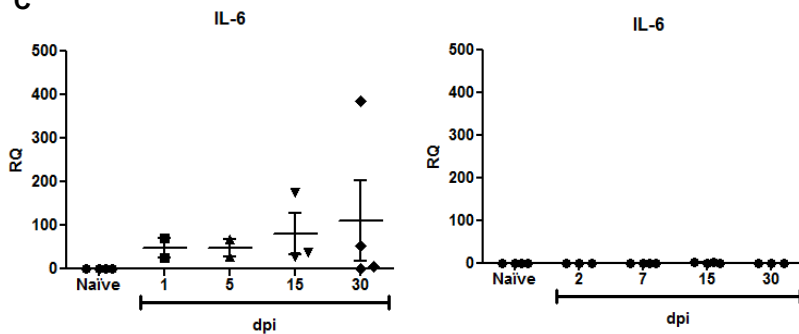
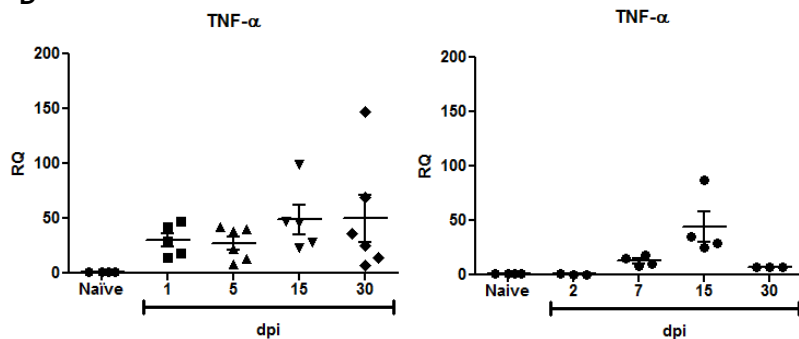
Figura 11- Histopatologia do tecido hepático de camundongos C57BL/6 durante infecção por *T. cruzi*, 15 e 30 dias após a inoculação (10x/40x, H&E).

4.3 Análise da expressão de citocinas pró-inflamatórias no fígado

Em animais Balb/C infectados por *T. rangeli* foram observados altos níveis de expressão em quantidade relativa (RQ) de IFN- γ desde o primeiro dia após a infecção. Cinco dias após a inoculação houve diminuição na expressão desta citocina, porém a alta expressão desta foi retomada 15 dias após a infecção e se manteve até 30 dpi. Por outro lado, a expressão de IFN- γ em níveis semelhantes só foi detectada em animais infectados com *T. cruzi* a partir de 7 dpi, com um leve aumento 15 dpi e retornando próximo ao nível basal de expressão 30 dias após inoculação (**Figura 12A**). IL-12p40 e IL-6 foram duas citocinas cuja expressão foi detectada somente em animais inoculados com *T. rangeli*. A expressão de ambas citocinas foi detectada desde 1 dpi até 30 dpi de maneira crescente, embora os níveis de IL-6 sejam visivelmente mais altos (**Figura 12 B e C**) .

TNF- α , por outro lado, foi detectada em ambos grupos experimentais. Em animais inoculados com *T. rangeli* sua expressão foi detectada desde 1 dpi mantendo o nível de expressão até 30 dpi. Em animais infectados com *T. cruzi*, a expressão de TNF- α foi detectada a partir de 7 dpi, chegando a sua expressão máxima 15 dias após a inoculação e aproximando-se ao nível basal 30 dpi (**Figura 12 D**). IL-10 foi a única citocina cuja expressão foi observada somente em animais inoculados com *T. cruzi*, embora tenha sido detectado apenas 15 dias após a inoculação (**Figura 12 E**).



B**C****D**

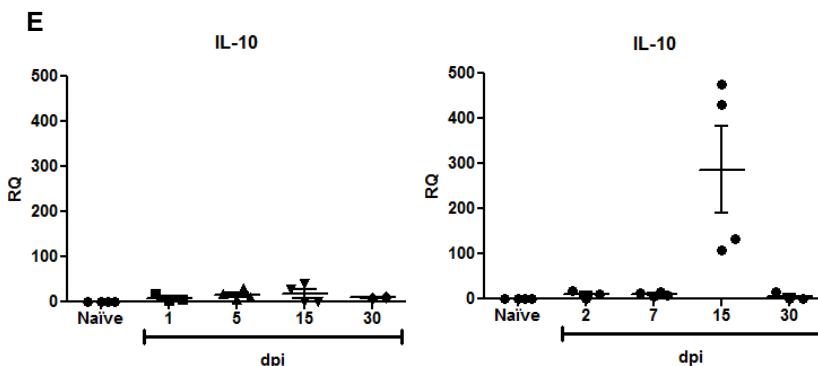


Figura 12 – Expressão gênica de citocinas no tecido hepático de animais Balb/C durante infecção por *Trypanosoma* spp. A expressão gênica das citocinas IFN- γ (A), IL-12p40 (B), IL-6 (C), TNF- α (D) e IL-10 (E) foi avaliada, sendo que os resultados referentes aos animais infectados com *T. rangeli* estão na coluna à esquerda, e os animais infectados com *T. cruzi* na coluna à direita. Os valores correspondem à média de 5 animais por ponto.

4.4 Dosagem dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias

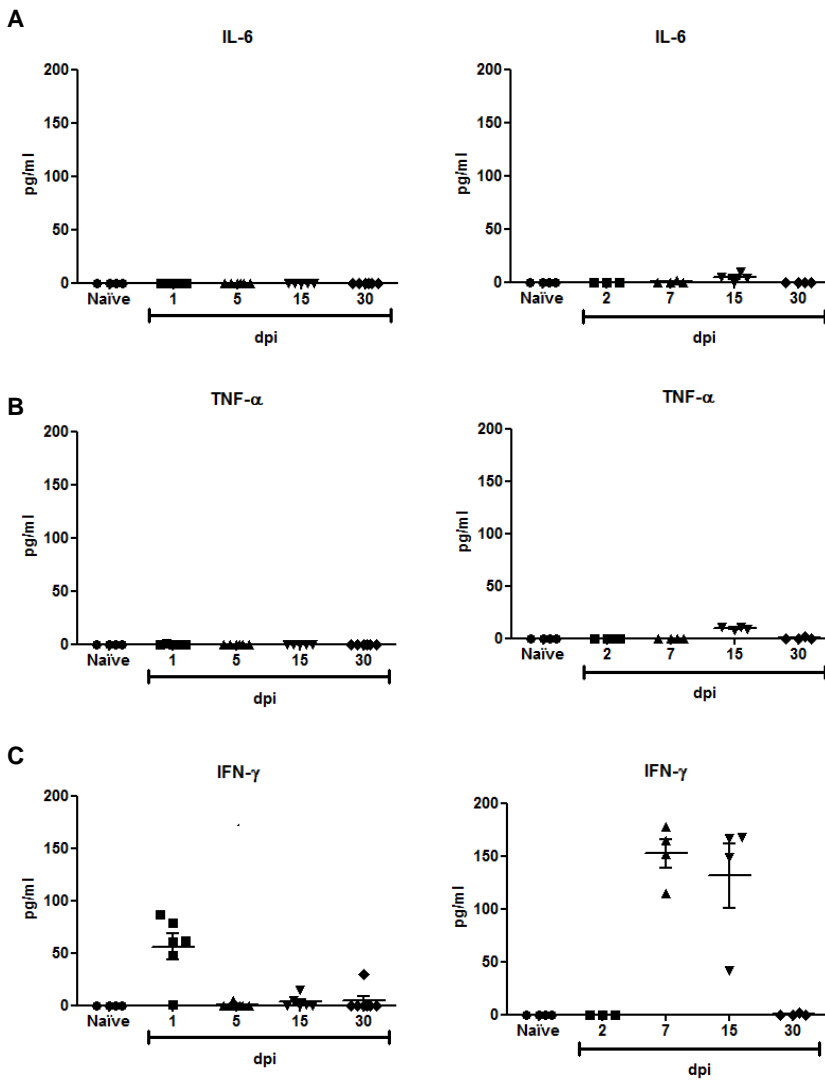
Após verificar a expressão de citocinas no tecido hepático, o passo seguinte consistiu na detecção destas proteínas no soro de camundongos infectados. A dosagem dos níveis séricos de citocinas por CBA mostrou a ausência de IL-6, TNF- α e IL-10 em animais inoculados com *T. rangeli* ou *T. cruzi* (**Figura 13 A, B e D**).

Por outro lado, os mediadores IFN- γ , IL-12p70 e MCP-1 apresentaram níveis elevados em animais infectados com *T. rangeli*. IFN- γ foi detectado no primeiro dia após a infecção, embora esta citocina não tenha sido detectada 15 e 30 dpi no soro. Em animais inoculados com *T. cruzi*, IFN- γ foi detectada em altos níveis 7 e 15 dpi, desaparecendo da circulação 30 dpi (**Figura 13 C**).

IL-12p70 foi dosada apenas no primeiro dia após a inoculação em animais infectados com *T. rangeli*. Em animais infectados com *T. cruzi*, a produção desta citocina foi detectada no sétimo dia, porém em uma concentração mais baixa do que a dosada para camundongos inoculados com *T. rangeli* (**Figura 13 E**).

Em contrapartida, MCP-1 apresentou um pico 1 dpi e pôde ser detectado em animais inoculados com *T. rangeli* em níveis mais baixos até 30 dpi. Camundongos infectados com *T. cruzi* apresentaram maior concentração de MCP-1 do que o observado em animais infectados com

T. rangeli detectada no sétimo dia e se manteve até 15 dpi para finalmente voltar ao nível basal 30 dpi (**Figura 13 F**).



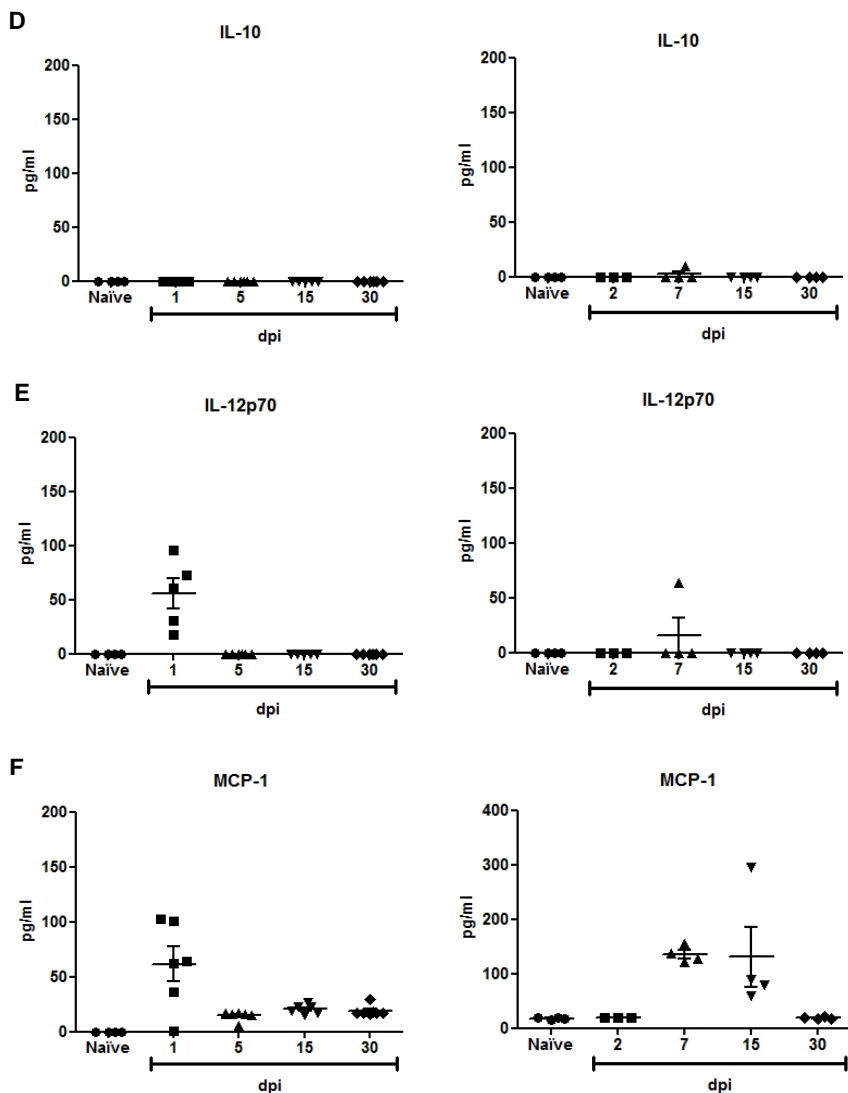


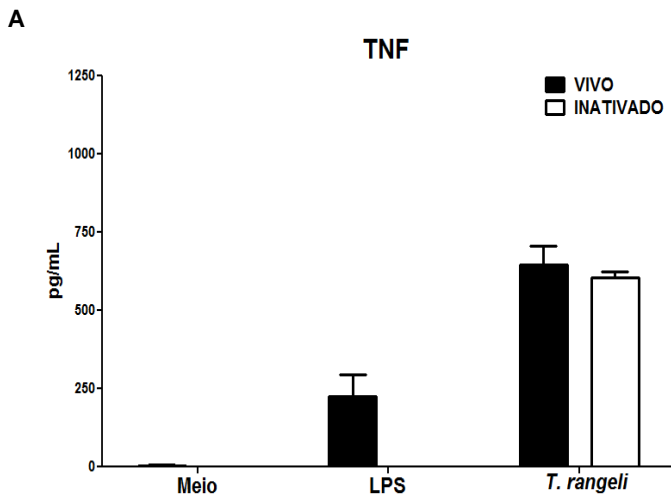
Figura 13 – Dosagem dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias em animais Balb/C infectados com *Trypanosoma* spp. Foi realizada a quantificação das citocinas IFN- γ (A), IL-6 (B), IL12-p40 (C), IL-10 (D), TNF- α (E) e MCP-1 (F) em animais infectados com *T. rangeli* (coluna esquerda) e animais infectados com *T. cruzi* (coluna direita). Os valores correspondem à média de 5 animais por ponto.

4.5 Infecção de BMMs

A análise histológica do tecido hepático revelou que *T. rangeli* promove um infiltrado inflamatório rico em macrófagos até 30 dias após a inoculação, sugerindo que estas células possam desenvolver um papel importante na interação parasito-hospedeiro. Para abordar essa hipótese, foi criado um modelo *in vitro* para entender melhor a interação do parasito com macrófagos.

4.5.1 Dosagem de citocinas pró-inflamatórias *in vitro*

A dosagem de citocinas foi realizada 18 horas após a infecção de BMMs com *T. rangeli* ou *T. cruzi*. Observa-se que houve produção de TNF- α em níveis semelhantes tanto parasitos vivos quanto para parasitos inativados (**Figura 14 A**). As células produziram altos níveis de IL-6 quando incubadas com parasitos vivos ou inativados, embora a sua concentração esteja presente em menor quantidade em células incubadas com parasitos inativados (**Figura 14 B**).



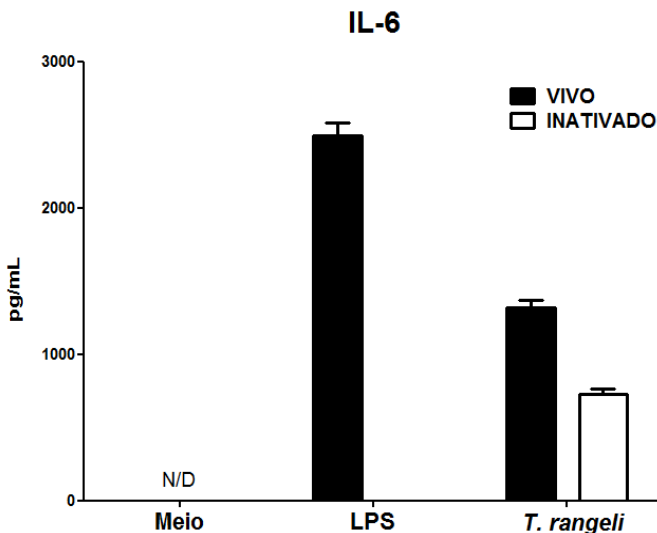
B

Figura 14- Dosagem das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (A) e IL-6 (B) no sobrenadante de BMMs 18 horas após infecção com *T. rangeli*.

4.5.2 Interação *T. rangeli*- *BMM*

Tendo em vista que os parasitos podem ser reconhecidos pelas células, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, o próximo passo consistiu em avaliar a interação e consequente entrada do parasito nas células. As micrografias referentes a estas infecções podem ser observadas na **Figura 15**. Na visualização por microscopia de luz, observa-se formas amastigotas de *T. cruzi* bastante características dentro das células, enquanto nas células infectadas com *T. rangeli*, não se nota o mesmo. Nestas células podemos observar a presença de parasitos, embora estes não apresentem o mesmo formato característico observado em *T. cruzi*. Apesar de ser usado o mesmo MOI de infecção para ambos parasitos, é visível uma grande diferença no número de parasitos intracelulares.

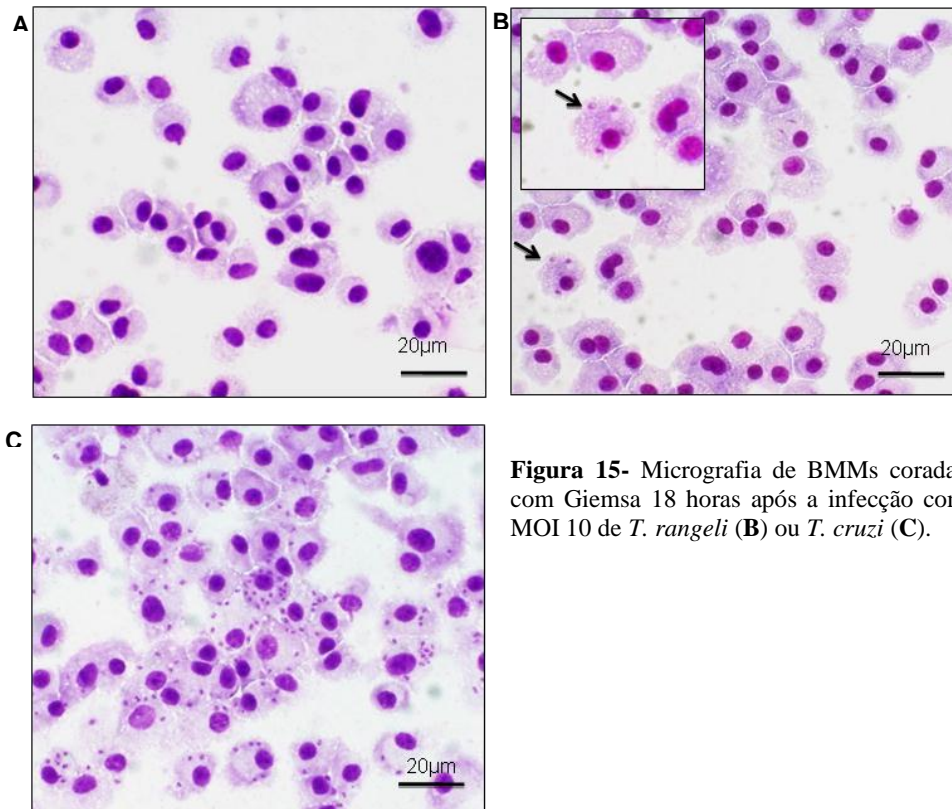
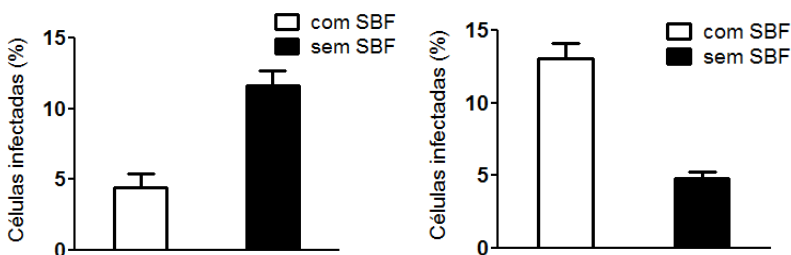


Figura 15- Micrografia de BMMs coradas com Giemsa 18 horas após a infecção com MOI 10 de *T. rangeli* (**B**) ou *T. cruzi* (**C**).

Para avaliar a capacidade de infectividade de *T. rangeli*, os parasitos foram incubados juntamente com BMMs, na presença ou ausência de SBF. Uma possibilidade levantada foi o fato de que o SBF usado no meio poderia influenciar a infecção, pela associação de moléculas presentes no soro, como proteínas, que poderiam dificultar ou facilitar a entrada do parasito. Desta forma, foi realizada infecção com *T. rangeli* e *T. cruzi* e após 3 horas a placa foi fixada, de forma que a ausência de nutrientes no microambiente celular não afete o metabolismo das células.

A partir da análise dos resultados, podemos notar que no meio sem SBF houve maior percentagem de células infectadas por *T. rangeli*, assim como maior número total de parasitos intracelulares. Por outro lado, em células infectadas por *T. cruzi* o padrão observado foi o oposto, a presença de SBF parece ser importante para entrada do parasito (**Figura 16 A e B**). Como esperado, o aumento da entrada de *T. rangeli* na ausência de SBF refletiu no menor número de parasitos presentes no sobrenadante de infecção (**Figura 16 C**).

A



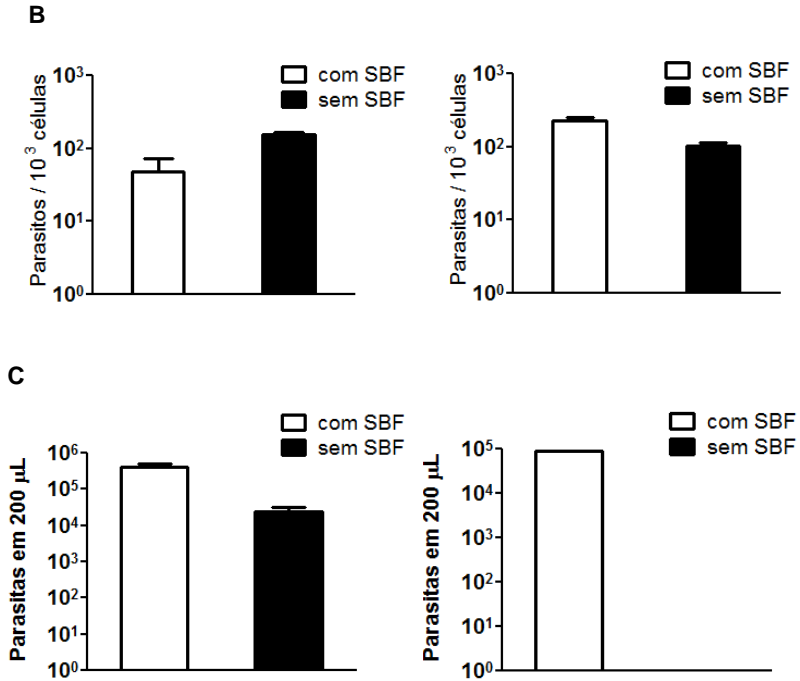


Figura 16- Infecção de BMMs com *Trypanosoma* spp. em meio DMEM na presença ou ausência de SBF. Foi determinada a porcentagem de células infectadas (**A**), índice de infecção (**B**) e parasitos contados no sobrenadante de infecção (**C**), sendo que a coluna à esquerda representa células infectadas com *T. rangeli* e à direita infectadas com *T. cruzi*.

5. DISCUSSÃO

Apesar de *T. rangeli* ser considerado um parasito não patogênico, a partir das análises histopatológicas dos tecidos de animais infectados, podemos notar que este parasito causa um processo de esteatite sub aguda no tecido hepático a partir de 15 dpi, além de uma intensa ativação de macrófagos no fígado, observada até 30 dpi, indicando, apesar de não ser de uma forma clássica, um processo inflamatório hepático.

A degeneração observada nos animais Balb/C pode ocorrer por degradação glicogênica, processo no qual a glicose é reabsorvida pelos hepatócitos, sendo armazenada excessivamente na forma de glicogênio, levando ao aumento do citoplasma, além de conferir às células um aspecto vacuolizado, que se assemelha à degeneração hidrópica. Como o glicogênio é solúvel em água, ele é perdido neste tipo de preparação, desta forma, para poder determinar de fato o tipo de degeneração, seria necessário realizar um tratamento específico na montagem das lâminas.

Embora os parasitos não sejam mais detectados na circulação 11 dias após a inoculação, é observada inflamação no tecido hepático até 30 dpi o que indicaria um processo inflamatório crônico. Possivelmente algum produto do metabolismo ou até mesmo debris do parasito podem permanecer no tecido, mantendo um estímulo prolongado mesmo na ausência de *T. rangeli*, o que seria responsável pela manutenção da resposta inflamatória.

Estudos recentes apontam a importância do tecido adiposo na infecção por *T. cruzi*, mostrando que este tecido oferece um ambiente adequado para o parasito. É observada a presença de pseudocistos com amastigotas ou tripomastigotas em macrófagos e adipócitos associados a infiltrados linfocíticos, sugerindo que populações de parasitos podem usualmente colonizar tecidos gordurosos (TANOWITZ *et al.*, 2011). Apesar de não ter sido observado nenhuma forma biológica dos parasitos no tecido por coloração H&E, foi observada a presença de um infiltrado inflamatório misto bastante intenso, o que sugere que *T. rangeli* possa ter passado por este tecido.

Curiosamente, em ambos tecidos onde foi detectada uma resposta inflamatória intensa, há grande acúmulo de energia na forma de glicogênio e também lipídeos em várias fases de processamento. O direcionamento para estes tecidos pode se dar pela fato de se tratarem de locais que ofereçam substrato nutricional para o parasito. Estes tecidos entram rapidamente em contato com os tripomastigotas, uma vez que a

via inoculativa é i.p. e os parasitos podem chegar ao fígado pelo sistema porta.

Por outro lado, a observação de infiltrados inflamatórios pode ser correlacionada com a presença de mediadores como citocinas ou quimiocinas pró-inflamatórias no início da infecção, que podem atuar de modo a atrair células para o local, além de ativar diversos tipos celulares para gerar uma resposta efetiva contra o agente invasor. Em camundongos inoculados com *T. rangeli*, IFN- γ e IL-12 foram as únicas citocinas cujo aumento da expressão foi observada por qPCR e puderam ser detectadas no soro de animais Balb/C. Ambas as citocinas foram detectadas somente no primeiro dia após a infecção no soro dos camundongos, embora o aumento de sua expressão também tenha sido observada em intervalos mais tardios.

É importante ressaltar que o PCR tempo real avalia a produção do RNA mensageiro que, após processamento, dará origem à citocina. Em outras palavras, a expressão do gene referente à citocina não significa necessariamente que haverá a presença da proteína, uma vez que há outras etapas regulatórias no seu processamento. Além disto, a partir do momento em que a citocina é produzida, esta vai ser detectada no soro somente quando os níveis são altos o suficiente para chegarem na corrente sanguínea, caso contrário, sua localização ficará restrita ao tecido.

Sabe-se que IL-12 é produzida por células da imunidade inata como monócitos, macrófagos, neutrófilos e DCs ativados além de células da imunidade adaptativa, como Th1, linfócitos T citotóxicos e células B, atuando como um importante fator estimulador de NKs (HEINZEL *et al.*, 1997). Além disto, altos níveis de IFN- γ promovem a atividade citotóxica de várias células, aumentando a morte de microrganismos por macrófagos pela indução de NADPH oxidase, levando à produção de intermediários de NO, depleção de triptofano e aumento na regulação de enzimas lisossomais (MACMICKING *et al.*, 1997), além de regular a expressão proteica de MHC de classe I e II e consequentemente, a apresentação de antígenos (WENNER *et al.*, 1996). IFN- γ também é importante na regulação das interações leucócito-endoteliais através do aumento na expressão de quimioatrativos como MCP-1 e moléculas de adesão, como ICAM-1 (ROLLINS *et al.*, 1990).

De fato, a quimiocina MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) também foi detectada no soro de camundongos infectados 1 dpi, o que explicaria o rápido aparecimento de um infiltrado inflamatório no tecido

hepático de animais inoculados com *T. rangeli*. Em animais infectados com *T. cruzi*, MCP-1 foi detectado apenas no sétimo dia, o que é visto na histopatologia, pois há ausência de infiltrado em cortes referentes aos intervalos anteriores. A presença desta quimiocina até 30 dpi em animais inoculados com *T. rangeli* explicaria a presença de inflamação no tecido ainda que não sejam mais detectados parasitos na corrente sanguínea. MCP-1, também conhecida como CCL2 (*Chemokine (C-C motif) ligand 2*), é uma quimiocina que atua no recrutamento de monócitos, células T de memória, DCs para locais de dano tecidual, infecção ou inflamação. Este mediador possui uma atividade quimiotática para monócitos e basófilos, mas não neutrófilos ou eusínófilos, o que explicaria a presença do infiltrado predominantemente monocuclear observado nos animais inoculados.

O aumento da expressão de IL-6 foi observado em animais infectados com *T. rangeli*, embora não haja diferença em animais infectados com *T. cruzi*. Isto indicaria que IL-6 é um mediador característica da infecção por este parasito. IL-6 é uma citocina pleiotrópica envolvida em resposta de fase aguda, hematopoiese e inflamação. A maior fonte desta citocina é por células endoteliais, fibroblastos, monócitos e macrófagos em resposta a diferentes estímulos durante inflamações sistêmicas. Sabe-se que na imunidade inata, IL-6 dirige o tráfego de leucócitos e ativação e induz produção de proteínas de fase aguda nos hepatócitos (HURST *et al.*, 2001). O pico de IL-6 observado na fase aguda da infecção correspondeu ao aumento citoplasmático observado nos hepatócitos, o que está realacionado com o aumento da atividade celular e produção de enzimas.

Em animais infectados com *T. cruzi*, foi observada a ausência de IL-6 e IL-12p40 tanto na expressão quanto sua dosagem no soro. Embora tenha sido notada a expressão de TNF- α e IL-10 no tecido hepático, estas citocinas não foram detectados no soro. Por outro lado, foi observado um aumento de 20-30 vezes na expressão de IFN- γ no sétimo dia que se manteve até 15 dpi, o que foi confirmado pela detecção de altos níveis de IFN- γ no soro nestes mesmos intervalos. A dosagem no soro também revelou altos níveis de MCP-1 7 e 15 dpi, que juntamente com IFN- γ , corresponde com o aparecimento do infiltrado e sua intensificação no tecido hepático.

A presença de um infiltrado mononuclear parece ser característica da infecção por *T. rangeli*, uma vez que em *T. cruzi* há presença de infiltrado misto além de necrose intensa. A ausência de necrose na maioria dos intervalos após a infecção por *T. rangeli*, explicaria o fato

do infiltrado na infecção por *T. cruzi* ser misto, uma vez que necrose intensa atrairia não somente monocleares, mas também plasmócitos.

Apesar de macrófagos aparentemente exercerem um papel importante na infecção por *T. rangeli*, como observado na histopatologia de animais infectados, quando observada a interação do parasito com esta célula *in vitro*, não parece se tratar de uma célula adequada para replicação do parasito. A entrada de parasitos é visivelmente menor quando comparada àquela de *T. cruzi*, o que reflete a baixa infectividade, sugerindo que a infecção por este parasito é controlada rapidamente.

Quanto à presença de parasitos no sobrenadante da infecção notamos que há uma grande perda de tripomastigotas quando somamos o número de parasitos que de fato entraram nas células e os encontrados no sobrenadante. Isto pode estar relacionado por morte causada via complemento, uma vez que infecções realizadas na ausência de SBF levaram à uma maior taxa de entrada e menor número de parasitos no sobrenadante. Entretanto, na ausência de SBF, não foi detectado *T. cruzi*, o que sugere que na infecção por este parasito, o soro desempenha um papel importante na sua sobrevida.

A produção de citocinas durante a infecção por *T. rangeli*, parece ser independente do parasito estar vivo ou inativado, o que sugere que o fator estimulante desta resposta possa ser alguma molécula não-protéica.

6. CONCLUSÕES

- Durante a infecção há inflamação com presença de infiltrado mononuclear persistente no tecido hepático, sugerindo que o *T. rangeli* é reconhecido por células do sistema imune *in vivo*.
- A infecção por *T. rangeli* gera um perfil de citocinas pró-inflamatórias consistentes (IL-12, MCP-1 e IFN- γ) sugerindo que há uma resposta inflamatória contra o parasito.
- Macrófagos reconhecem *T. rangeli* e produzem citocinas em resposta ao parasito;
- Algum componente presente no SBF pode afetar a viabilidade do *T. rangeli in vitro*

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFCHAIN, D.; LE RAY, D.; FRUIT, J.; CAPRON, A. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: identification of a specific component. **J parasitol.** 65: 507-514, 1979.

AKIRA, S; TAKEDA, K; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat. Immunol.** 2: 675-680, 2001.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell.** 124:783–801, 2006.

AÑEZ, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. 1. Deposition, migration and growth of *T. rangeli* in two mammals. **Canning Parasitological Topics**. Special Publication of the Society of Protozoologists. 19-25, 1981.

AÑEZ, N.; VELANDIA, J.; RODRÍGUEZ, A. M. Estudios sobre *T. rangeli* Tejera, 1920. VIII. Respuestas a las reinfecciones en los mamíferos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 80: 149-153, 1985.

ANDRADE, L.O.; ANDREWS, N.W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nat. Rev. Microbiol.** 8:19-23, 2005.

BAFICA, A.; SANTIAGO, H. C.; GOLDSZMID, R.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T.; SHER, A. Cutting Edge: TLR9 and TLR2 signaling together accounts for the MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.** 175:1-5, 2006.

CAMARGO, M.M.; ALMEIDA, I.C.; PEREIRA, M.E.; FERGUSON, M.A.; TRAVASSOS, L.R.; GAZZINELLI, R.T. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. **J. Immunol.** 158: 5890-5901, 1997.

CHESSLER, A.D.; FERREIRA, L.R.; CHANG, T.H.; FITZGERALD, K.A.; BURLEIGH, B.A. A novel IFN regulatory factor 3-dependent pathway activated by trypanosomes triggers IFN-beta in macrophages and fibroblasts. **J. Immunol.** 181:7917-7924, 2008.

COURA, J.R.; FERNÁNDEZ, O.; ARBOLEDA, M.; BARRET, T.V.; CARRARA, N.; DEGRAVE, W.; CAMPBELL, D.A. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 90: 278-279, 1996.

CUBA, C. A. C. Review of biological and diagnostic aspects of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 31:207-220, 1998.

D'ALESSANDRO-BACIGALUPO, A.; GORE-SARAVIA, N. *Trypanosoma rangeli*. *Parasitic Protozoa*. p. 1-54, 1992.

DE SOUSA, M.A.; DOS SANTOS PEREIRA, S.M.; DOS SANTOS FAISSAL, B.N. Variable sensitivity to complement-mediated lysis among *Trypanosoma rangeli* reference strains. **Parasitol Res.** Jul 12, Epub, 2011.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cad. Saúde Pública.** 23:13-22, 2007.

EGER-MANGRICH, I.; OLIVEIRA, M.; GRISARD, E.C; SOUZA, W.; STEINDEL, M. Interaction of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 with different cells line in vitro. **Parasitol. Res.** 87:505-509, 2001.

GARCIA, E.S.; MELLO, C.B.; AZAMBUJA, P.; RIBEIRO, J. M. C. *Rhodnius prolixus*: salivary anti-hemostatic components decrease *Trypanosoma rangeli* infection. **Exp. Parasitol.** 78:287-293, 1994.

GARCIA, E. S.; RATCLIFFE, N. A.; WHITTEN, M. M.; GOZALEZ, M. S.; AZAMBUJA, P. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi* – *Rhodnius prolixus* interactions. **J Insect Physiol.** 53:11-21, 2007.

GARCIA, E. S.; CASTRO, D. P.; FIGUEIREDO, M. B.; GENTA, F. A.; AZAMBUJA, P. *Trypanosoma rangeli*: a new perspective for

studying the modulation of immune reactions of *Rhodnius prolixus*. **Parasites & vectors**. 2(1):33, 2009.

GRAEFE, S.E.; JACOBS, T.; GAWORSKI, I.; KLAUENBERG, U.; STEEG, C.; FLEISCHER, B. Interleukin-12 but not interleukin-18 is required for immunity to *Trypanosoma cruzi* in mice. **Microbes. Infect.** 5:833-839,2003.

GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. Em: NEVES, D.P., Ed. Parasitologia Humana. Atheneu. 2005.

GRISARD, E. C.; STEINDEL, M.; GUARNERI, A. A.; EGER-MANGRICH, I.; CAMPBELL, D. A.; ROMANHA, A. J. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 94: 203-209, 1999.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 98(4):435-42, 2003.

HEINZEL, F.P.; HUJER, A.M.; AHMED, F.N.; RERKO, R.M. In vivo production and function of IL-12 p40 homodimers. **J Immunol**.158:4381-8, 1997.

HERBIG-SANDREUTER, A. Experimental study of the life cycle of *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920 in warm-blooded animals and in *Rhodnius prolixus*. **Acta Trop**. 12:261-264, 1955.

HOLSCHER, C.; KOHLER, G.; MULLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G.A.; BROMBACHER, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infect. Immun.** 66:1208-1215, 1988.

HURST, S.M.; WILKINSON, T.S.; MCLOUGHLIN, R.M.; JONES, S.; HORIUCHI, S.; YAMAMOTO, N.; ROSE-JOHN, S.; FULLER, G.M.; TOPLEY, N.; JONES, S.A. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. **Immunity**. 14:705-14, 2001.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat. Immunol.** 5: 987–995, 2004.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes & infection.** 12:511-517, 2010.

Koerich, L.B; EMMANUELLE-MACHADO, P.; SANTOS, K.; GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: High production of infective trypomastigote forms *in vitro*. **P. Research.** 88:21-25, 2002.

KOGA, R.; HAMANO, S.; KUWATA, H.; ATARASHI, K; OGAWA, M.; HISAEDA, H.; YAMAMOTO, M.; AKIRA, S.; HIMENO, K.; MATSUMOTO, M.; TAKEDA, K. TLR-dependent induction of IFN-beta mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.** 177:7059-7066, 2006.

MACMICKING, J.; XIE, Q.W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu Rev Immunol.** 15:323-50, 1997.

Medzhitov, R.; Janeway, C. Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunol. Rev.** 173: 89–97, 2000.

MENEZES, C.A. S.; ROCHA, M.O. C.; SOUZA, P. E. A.; CHAVES, A.C.L.K.; GOLLOB, J.; DUTRA, W.O. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. **Clin. Exp. Immunol.** 137:129-138, 2004.

MORAES, M.H.; GUARNERI, A.A.; GIRARDI, F. P.; RODRIGUES, J. B.; EGER, I.; TYLER, K.M.; STEINDEL, M.; GRISARD, E.C. Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. **Parasites & Vectors.** 1:1-10, 2008.

MYLER, P.J. Molecular variation in trypanosomes. **Acta Trop.** 53:205-225, 1993.

OLIVEIRA, A.C.; PEIXOTO, J.R.; DE ARRUDA, L.B.; CAMPOS, M.A.; GAZZINELLI, R.T.; GOLENBOCK, D.T.; AKIRA, S.; PREVIATO, J.O.; MENDONCA-PREVIATO, L.; NOBREGA, A.; BELLIO, M. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. **J. Immunol.** 173:5688-5696, 2004.

OSORIO, Y.; TRAVI, B.; PALMA, G.I.; SARAVIA, N.G. Infectivity of *Trypanosoma rangeli* in a promonocytic mammalian cell line. **J Parasitol.** 81: 687-693, 1995.

PEREIRA DA SILVA, L.H.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa do *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clin Bio.** 20:191-207, 1953.

ROLLINS, B.J.; YOSHIMURA, T.; LEONARD, E.J.; POBER, J.S. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. **Am J Pathol.** 136:1229-1233, 1990.

SCHOTTELIUS, J. Neuraminidase fluorescence test for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Trop Med Parasitol.** 38:323-327, 1987.

SCORZA C.; URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920. Preliminary report on histopathology in experimentally infected mice. **Rev Inst Med Trop.** 28: 371-378, 1986.

SILVA, G.K.; GUTIERREZ, F.R.; GUEDES, P.M.; HORTA, C.V.; CUNHA, L.D.; MINEO, T.W.; SANTIAGO-SILVA, J.; KOBAYASHI, K.S.; FLAVELL, R.A.; SILVA, J.S.; ZAMBONI, D.S. Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection, **J. Immunol.** 184:1148-1152, 2010.

SONNENFELD, G.; KIERSZENBAUM, F. Increased serum levels of an interferon-like activity during the acute period of experimental

infection with different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 30:1189-1191, 1981.

SOUZA, W.; CARVALHO, T.M.U.; BARRIAS, E.S. Review on *Trypanosoma cruzi* host-cell interaction. **Int. J. Cell Biol.** 2010: 295394, 2010.

STEVENS, J.R.; NOYES, H. A.; SCHOFIELD, C.J.; GIBSON, W. The molecular evolution of Trypanosomatidae. **Adv. Parasitol.** 48:1-56, 1999.

STOCO, P.H. Caracterização das DNA topoisomerasas II de *Trypanosoma rangeli*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 162 p., 2010.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.** 21: 335–376, 2003.

TALVANI, A.; ROCHA, M. O. C.; RIBEIRO, A. L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; TEIXEIRA, M. M. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. **J. Infect. Dis.** 189:214-220, 2004.

TANOWITZ, H.B.; JELICKS, L.A.; MACHADO, F.S.; ESPER, L.; QI, X.; DESRUISSEAU, M.S.; CHUA, S.C.; SCHERER, P.E.; NAGAJYOTHI, F. Adipose tissue, diabetes and Chagas disease. **Adv Parasitol.** 76:235-50, 2011.

TORRICO, F.; HEREMANS, H.; RIVERA, M.T.; VAN MARCK, E.; BILLIAU, A.; CARLIER, Y. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J. Immunol.** 146:3626-3632, 1991.

TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nat. Rev. Immunol.** 7:179-190, 2007.

UMEKITA, L.F.; MOTA, I. How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 33:253-258, 2000.

URDANETA-MORALES, S.; TEJERO, F. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: mouse model for high, sustained parasitemia. *J Parasitol*, v. 71, p. 409-414, 1985.

VALLEJO, G.A.; MARINKELLE, C.J.; GUHL, DE SÁNCHEZ, F. Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en el intestino del vector *Rhodnius prolixus*. **Rev Bras Biol.** 48: 577-587, 1988.

VALLEJO, G.A.; GUHL, F.; SCHAUB, G.A. Triatomine-*Trypanosoma cruzi/rangeli*: vector-parasite interactions. **Acta Trop.** 110:137-147, 2009.

WENNER, C.A.; GÜLER, M.L.; MACATONIA, S.E.; O'GARRA, A.; MURPHY, K.M. Roles of IFN-gamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development. **J Immunol.** 156:1442-7, 1996.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Control of Chagas disease. Second Report of the WHO Expert Committee, **World Health Organization**, Brasilia. 2002.106p.